

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XLV, HEFT 1
MIT 73 TEXTABILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 23. MAI 1955



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1955

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Speh, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLV. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Abhandlungen

Seite

Kaunat, H.: Die Wirkung von Antibiotika auf <i>Paramaecium caudatum</i>	1
Markert, Susanne: Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen	37
Böing, J.: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granstruktur in den Chloroplasten von <i>Helodea densa</i>	55
Kinzel, H.: Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange	73
Frey-Wyssling, A., F. Ruch und X. Berger: Monotrope Plastiden-Metamorphose	97
Hagedorn, H.: Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt bei Actinomycceten	115
Currier, H. B., and W. van der Zweep: Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in <i>Anacharis canadensis</i>	125

Sammelreferat

Baumeister, W.: Über den Einfluß des Zinks auf das Pflanzenwachstum	133
---	-----

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Die Wirkung von Antibiotika auf *Paramaecium caudatum*

Von

Helmut Kaunat

Aus dem Mikrobiologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Poppe)

Mit 25 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. Dezember 1954)

Einleitung

Über die Wirkung der Antibiotika auf Protozoen liegen verhältnismäßig wenige Untersuchungsergebnisse vor. Meistenteils handelt es sich um Angaben über die Toxizität und die Inhibitionswirkung der Antibiotika gegenüber pathogenen Protozoen. Das ist verständlich, denn Resistenzprüfungen an freilebenden Protozoen besitzen geringeres therapeutisches Interesse.

Wenn in der vorliegenden Arbeit ein freilebendes Protozoon als Versuchsobjekt benutzt wurde, so waren hierzu folgende Gründe maßgebend:

Erstens mehren sich die Angaben über Schädigungen des Organismus durch Antibiotika. Es wäre möglich, daß gewisse Schädigungen durch eine direkte Beeinflussung des Stoffwechsels von Gewebszellen durch die Antibiotika zustande kommen. Es wird deshalb eine Prüfung der Antibiotikawirkung an überlebenden Gewebszellen notwendig sein. Die gemeinsame Auswertung der an den Gewebszellen und der an freilebenden Protozoen gewonnenen Ergebnisse könnte dann u. U. eine schnellere Lösung des Problems herbeiführen.

Zweitens könnten cytomorphologische und physiologische Studien an antibiotikabehandelten Protozoen Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Antibiotika ergeben. Gewisse freilebende Protozoen wären wegen ihrer Größe, guten Durchsichtigkeit und leichten Züchtbarkeit für derartige Untersuchungen gut geeignet, vorausgesetzt, daß sie auf das betreffende Antibiotikum ansprechen. Es ist allerdings zu bedenken, daß durch Unterschiede in der Organisation der Protozoen-, Gewebs- und Bakterien-

zelle auch Unterschiede in der Wirkungsweise ein und desselben Antibiotikums bestehen können.

Paramecium caudatum, das Hauptobjekt der vorliegenden Untersuchungen, entspricht allen vorstehend geäußerten Forderungen. Es ist darüber hinaus von allen Protozoen am eingehendsten studiert worden (vgl. die Monographie von Kalmus, *Paramecium*, 1951), so daß Abweichungen von der Norm verhältnismäßig leicht festgestellt werden können.

Literaturübersicht

Nachstehend wird ein kurzer Abriss über diejenigen Arbeiten gegeben, die sich mit der Prüfung der Wirksamkeit von Penicillin, Streptomycin und Chloromycetin auf pathogene und freilebende Protozoen befassen (über Xanthocillin X liegen keine diesbezüglichen Untersuchungen vor):

Penicillin soll gegenüber *Plasmodium vivax* in vivo unwirksam sein (Lyons, Champ 1943; Herrel u. Mitarb. 1944).

Die gleiche Unwirksamkeit in vivo zeigt es gegenüber *Trypanosoma equiperdum* (Robinson 1943) und *Trypanosoma lewisi* (Augustine u. Mitarb. 1944).

Bei chronischer Amöbenruhr ließ sich eine Wirkungssteigerung durch Zugabe von Penicillin zu Emetinhydrochlorid und Sulfaguanidin erzielen (Merck's Jahresbericht, 1947—1948). Das Wachstum einer Reinkultur von *Trichomonas foetus* wird durch 1000—2500 IE/cm³ gehemmt (Colle 1947), und durch 80.000 IE/cm³ wird innerhalb einer Minute die Kultur abgetötet (Morgan u. Campbell 1946). Walter u. Mitarb. (Merck's Jahresbericht, 1951) erzielten durch Penicillin eine Besserung der Symptome bei *Trichomonasvaginitis*.

Lützenkirchen (1952) untersuchte den Einfluß verschiedener Antibiotika auf *Trichomonas vaginalis*. Der Autor stellte einen teilungshemmenden Einfluß von Penicillin erst bei einer Konzentration von 8000 IE/cm³ fest. Jirovec (1951) prüfte die Wirksamkeit des gelben Penicillins (Shenley) und des reinen kristallisierten Penicillins G (Lilly) gegenüber freilebenden Flagellaten (*Polytomella coeca*, *Polytoma uvella*, *Chilomonas paramecium*, *Euglena gracilis*) und fakultativ parasitisch (*Astasia chattoni*) bis parasitisch lebenden Flagellaten (*Strigomonas oncopelti*), ferner gegenüber *Glaucoma piriformis* (fakult. parasit. Ciliat). Es ergab sich, daß nur eine sehr hohe Konzentration des gelben Penicillins (50.000 IE/cm³) diese Protozoen (bis auf die grünen Euglenen) innerhalb 10—20 Minuten abtötet. Es ist bemerkenswert, daß die farblose *Euglena gracilis* bereits nach 30 Minuten abgetötet wurde, während die grüne *Euglena gracilis* noch nach 24 Stunden keine Schädigung aufwies. 10.000 IE/cm³ wurden von allen Protozoen gut vertragen. Das reine Penicillin G war selbst in einer Konzentration von 50.000 IE/cm³ für die Protozoen, außer *Chilomonas* (Abtötung nach 30 Minuten) und *Glaucoma* (Abtötung nach 3 Stunden), fast unschädlich. 100—1000 IE/cm³ verursachten keine Teilungshemmung.

Für **Streptomycin** liegen folgende Ergebnisse vor: Nach Molaret (Merck's Jahresbericht, 1947—1948) soll Streptomycin gegenüber patho-

genen Protozoen unwirksam sein. Das Antibiotikum eignet sich für die elektive Züchtung der *Entamoeba histolytica* aus dem Stuhl, da diese nicht angegriffen wird, während die anderen Keime der Faeces zugrunde gehen (Spingarn u. Edelman, Merck's Jahresbericht, 1949).

Auch Jirovec erwähnt, daß auf diesem Wege mittels Penicillin und Streptomycin Reinkulturen solcher Protozoenarten gewonnen werden können, die in einem stark verunreinigten Milieu leben, z. B. *Trichomonas vaginalis* und *Trichomonas foetus* (s. a. Lützenkirchen, l. c.).

Lützenkirchen konnte die Wirkungslosigkeit von Streptomycin gegenüber *Trichomonas vaginalis* innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 10.000 bis 100.000 SE/cm³ feststellen.

Jirovec (1948) prüfte die Wirksamkeit von Streptomycin — Calciumchloridkomplex (Merck) an den gleichen Protozoen, die schon oben genannt sind (Jirovec 1951). Darüber hinaus benutzte der Autor die grünen Flagellaten *Chlorogonium elongatum*, *Chlamydomonas pseudogloe* und *Euglena stellata*. Orientierende Versuche ergaben, daß selbst Konzentrationen von 10.000 bis 50.000 SE/cm³ für die Protozoen unschädlich sind; alle Arten blieben 24—48 Stunden am Leben, ohne daß Anzeichen einer Schädigung auftraten. Bei der Mehrzahl der Protozoen war jedoch die Teilung mehr oder weniger gehemmt. Bei *Polytoma uvella* und *Chilomonas paramaecium* verursachte eine Konzentration von 100 SE/cm³ eine vollständige Teilungshemmung. Bei *Polytoma* hemmten 10 SE/cm³ noch deutlich, bei *Chilomonas* noch 20 SE/cm³. Die Teilung von *Polytomella coeca* wurde durch 500 SE/cm³ vollständig gehemmt. Bereits 10 SE/cm³ bewirkten an *Chlorogonium elongatum* und *Chlamydomonas pseudogloe* die völlige Einstellung der Teilung.

Bei *Euglena gracilis*, *Euglena stellata* und *Astasia chattoni* trat oberhalb 20 SE/cm³ eine Verlangsamung der Vermehrung ein.

Streptomycin bewirkte ferner den Verlust des Chlorophylls z. B. bei *Euglena gracilis*, Stamm Pringsheim und Stamm Prowazoli, ferner bei *Euglena stellata*. Für *Euglena gracilis* genügten bereits 50 SE/cm³ und für *Euglena stellata* 25 SE/cm³, um den Verlust des Chlorophylls herbeizuführen. Nach der Überimpfung auf streptomycinfreie Nährböden ergrünten diese Formen wieder. Die Ergrünung erfolgte um so später, je höheren Streptomycinkonzentrationen diese Flagellaten anfangs ausgesetzt waren. Die Strigomonaden vermehrten sich auch bei 2000 SE/cm³ normal. *Glaucoma piriformis* erlitt durch 100—2000 SE/cm³ eine teilweise Teilungshemmung.

Über die Wirksamkeit des synth. Chloronitrins auf Protozoen liegen meines Wissens keine Untersuchungsergebnisse vor. Da jedoch das Chloronitrin den gleichen chemischen Aufbau und das gleiche biologische Wirkungsspektrum besitzt wie Chloromycetin, werden nachstehend die mit diesem Antibiotikum erzielten Ergebnisse mitgeteilt. **Chloromycetin** soll selbst in einer Konzentration von 1:500 gegenüber pathogenen Formen, wie *Tetrahymena geleii*, *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas foetus* innerhalb 48 Stunden unwirksam sein (Smith u. Mitarb. 1948). Eine Konzentration von 1:2000 bewirkt bei *Tetrahymena geleii* vollständige Teilungshemmung (Loeffler 1950).

An der freilebenden Amöbe *Pelomyxa carolinensis* konnten Smith u. Mitarb. (l. c.) ebenfalls die Unwirksamkeit von Chloromycetin feststellen, und über eine teilweise Teilungshemmung von *Euglena gracilis* durch eine Konzentration von 1 : 500 berichtet Loeffler (l. c.).

Jirovec (1951, l. c.) untersuchte die Wirkung von synth. Chloromycetin auf die gleichen Protozoen, die für die Penicillinversuche benutzt wurden. Es ergab sich, daß selbst Lösungen von 1 : 500 und 1 : 1000 für diese Protozoen nicht toxisch sind. Eine völlige Teilungshemmung ergab sich nur in einer Konzentration von 1 : 3000; bei 1 : 6000 bis 1 : 12.000 war die Teilung noch deutlich gehemmt, während bei 1 : 24.000 keine Wirkung zu verzeichnen war.

Experimentelles

1. Material und grundlegende Methodik

Das Hauptuntersuchungsobjekt war *Paramecium caudatum* (Ehrenb.). Jedoch wurden zur Ergänzung der an diesem Objekt gewonnenen Erkenntnisse auch andere Ciliatenarten benutzt (*Paramecium bursaria*, *Stylonychia mytilus*, *Spirostomum ambiguum* und *Coleps hirtus*).

Von *Paramecium caudatum* wurden im Verlauf der Untersuchungen drei Klone gezüchtet: Klon A, B und C.

Das Stammtier von Klon A wurde Anfang Mai in einem Rostocker Abwassergraben gefangen. Es war auffällig, daß das Wasser trotz seines hohen Gehaltes an *E. coli* nur sehr wenige Parameecien als auch andere Protozoen enthielt.

Die Individuen von Klon A enthielten anscheinend keinen Mikrokern. Jedenfalls war dieser weder durch Färbungen noch im Phakonachzuweisen. Dessenungeachtet verlief der Teilungsmodus über zweieinhalb Monate normal. Nach diesem Zeitraum sank die Teilungsrate ab, so daß der Klon für weitere Untersuchungen ausschied.

Herkunftsort von Klon B war ein Dorfteich in der Umgegend von Rostock. Fangzeit: Anfang Juli.

Klon C entstammte einem Aquarium des Zoologischen Instituts. Die Rohkultur, aus der dieser Klon herausgezüchtet wurde, enthielt sehr viele Konjugationsstadien. An vielen Exkonjuganten war eine Endomixis festzustellen. Erstaunlich war, daß selbst unter den Klontieren noch vereinzelt eine Endomixis auftrat.

Anlage und Kultur der Klone

Ein einzelnes *Paramecium* wurde der Rohkultur entnommen und nach mehrmaliger Passage durch sauberes Wasser in das bakterienhaltige Medium übertragen. Der bereits nach mehreren Tagen über tausend Individuen zählende Klon wurde in etwa $\frac{1}{2}$ Liter Nährmedium enthaltende Bechergläser aus Jenaer Glas umpipettiert und diese an einem kühlen und mäßig hellen Ort aufgestellt.

Das Nährmedium bestand aus 1 : 90 verdünnter Pferdefleischbouillon, der kleine Steckrübenstückchen zugegeben wurden. Die Impfung des

Mediums erfolgte mit einigen Tropfen einer Reinkultur von *Escherichia coli*. Alle 10 bis 14 Tage wurde ein kleiner Teil der Massenkulturen von *Paramaecium* in frisches Nährmedium umpipettiert.

Für die Versuchsserien bestand das Nährmedium aus einem Teil der normalen Pferdefleischbouillon, einem Teil Weizenabkochung und 90 Teilen abgekochtem und filtriertem Wasser aus einem Freilandwasserbecken. Die Impfung erfolgte mit einer 24 Stunden alten Kultur von *E. coli*.

Verursachte jedoch unter gewissen Kulturbedingungen das Antibiotikum eine so starke Hemmung des Bakterienwachstums, daß durch die unterschiedlichen Ernährungsbedingungen in den Versuchs- und Kontrollkulturen die Richtigkeit der Ergebnisse gefährdet schien, dann wurden die *Paramaecien* mit suspendierten Hefezellen gefüttert. Für die Zubereitung des Hefemediums wurde das Trockenhefepräparat „Levurino“ der Zymablaes A. G., München, verwandt. 140 mg Trockenhefe wurden in 100 cm³ kaltem Wasser durch Schütteln gleichmäßig suspendiert.

In dieser Hefesuspension entwickelte sich regelmäßig fast ausschließlich *B. subtilis*, der, wie sich später herausstellte, gegenüber Chloronitrin und Xanthocillin eine hohe Resistenz aufwies. Die *Paramaecien* gediehen und vermehrten sich in diesem Medium recht gut, nur mußte darauf achtgegeben werden, daß die Versuchstemperatur möglichst nicht 25° C überstieg, da sonst die Hefe eine zu starke Gärung erzeugte.

Über die verwandten Kulturgefäße sei folgendes gesagt: Unentbehrlich erwiesen sich mit tiefem Hohlsliff (0,5 cm³) versehene dicke Objektträger. Der Hohlsliff wurde durch 10 mm hohe Glasschälchen mittels Vaseline luftdicht abgeschlossen. Zwecks kurzzeitiger Beobachtung mit dem Binokular konnten die Schälchen schnell und bequem entfernt und wieder dicht aufgesetzt werden.

Zur Vermeidung plötzlicher Temperaturschwankungen wurden die Objektträgerkulturen in eine feuchte Kammer gestellt.

War jedoch eine mehrtägige Züchtung der Protozoen notwendig, dann wurden Kristallisierschälchen, die 5 cm³ Nährlösung aufnehmen, benutzt. Auch diese wurden gut abgedichtet und in eine gemeinsame feuchte Kammer gestellt.

Die Versuchstemperatur schwankte zwischen 24 und 26° C.

Die häufig vorkommende Auszählung der Protozoen wurde mit besonderen Glaskapillaren durchgeführt. Zum Auszählen kleinerer Mengen Protozoen und zum Überimpfen derselben dienten lang ausgezogene dünne Kapillaren mit einem nur ca. 5 mm langen Mundstück. Diese von Spek verbesserten Kapillaren besitzen den Vorzug, daß sie trotz ihrer Länge während des Zählens nahe an der Spitze angefaßt werden können; denn durch das kurze und daher leichte Mundstück wird die Kapillare nur wenig nach unten gebogen. Ich fertigte mir die Kapillaren aus einem Glasrohr von 3 mm lichter Weite und 0,8 mm Wandstärke. Die Spitze der Kapillare wurde zu einer noch feineren Kapillare von etwa 8 mm Länge ausgezogen, durch die die Protozoen aber noch reibungslos hindurchgleiten konnten.

Zum Auszählen mehrerer tausend Protozoen dienten mir etwa 6 cm lange Gummipipetten von ca. 5 mm Innendurchmesser, deren vorderes Ende zu-

nächst möglichst stumpfkegelig und dann zu einer kurzen feinkapillaren Spitze ausgezogen wurde.

Vor Beginn der Zählung wurde der Inhalt des betreffenden Kulturschälchens in ein dickwandiges Uhrglas mit flachem Boden (sog. Zimmermannsglas) entleert. Etwas umständlicher gestaltete sich die Auszählung bei Anwendung des Hefemediums. Die Hefezellen setzten sich nämlich als Bodensatz ab, und mit Vorliebe schwammen die Paramaecien in diesem herum. Es war dann nur möglich, durch Entnahme kleiner Mengen des Bodensatzes und seine Verdünnung mit Wasser eine genaue Zählung durchzuführen.

Folgende Antibiotika wurden auf ihre Wirksamkeit geprüft:

Penicillin-Calciumsalz, mit einer Wertigkeit von 1100 IE/mg.

Streptomycin-Calciumchlorid, mit einer Wertigkeit von 507 SE/mg.

Streptomycin-Hydrochlorid, mit einer Wertigkeit von 770 SE/mg.

Chloronitrit, synthetisch gewonnenes Antibiotikum des Strahlenpilzes *Streptomyces venezuelae* (vgl. Chloromycetin).

Xanthocillin X, von W. Rothe 1948 aus dem Mycel von *Penicillium notatum* Westling isoliertes Antibiotikum mit der Summenformel: $C_{18}H_{14}O_2N_2$.

Die ersten vier Präparate sind Erzeugnisse der „Jenapharm“, während Xanthocillin X vom Arzneimittelwerk Dresden hergestellt wird.

Penicillin, Streptomycin und Chloronitrit sind wasserlöslich. Beim Chloronitrit ist allerdings ein kurzes Aufkochen nötig, damit es vollständig in Lösung geht.

Xanthocillin X ist thermostabil und nur in Alkohol, Äther und Natronlauge bis zu 1% löslich (weitere Angaben s. R. Beiersdorf und W. Ahrens 1953). Es wurden 10 mg Xanthocillin in 10 cm³ 1/20 norm. Natronlauge so lange gekocht, bis kein Rückstand mehr vorhanden war und die Lösung eine intensiv gelbe Färbung aufwies. Umgehend wurden dann mit einer Mikropipette abgestufte Mengen dieser Lösung in das Kulturmedium übertragen¹.

2. Versuchsergebnisse und spezielle Methodik

a) Der Wirkungsverlauf in Abhängigkeit von der Konzentration

Versuchsführung:

Hohlgeschliffene Objektträger wurden mit je 0,5 cm³ der antibiotischen Lösung abgestufter Konzentration versehen und sofort mit Schälchen abgedeckt. 10 Paramaecien wurden dann in je eine Konzentrationsstufe überimpft und der Zeitpunkt der Überimpfung notiert. Die kurzzeitige Beobachtung der Objekte erfolgte mit dem Binokular bei 16- bis 42facher Ver-

¹ Wie die Tab. 5 zeigt, besteht beim Xanthocillin trotz seiner Wasserunlöslichkeit eine Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration. Dies führt zu der Vorstellung, daß sich das Antibiotikum in Form von Mikrokristallen den Zelloberflächen anlagert und resorbiert wird. In Annäherung würde demnach die Abtötungszeit von der Anzahl der in der Volumeneinheit vorhandenen Mikrokristalle abhängen.

größerung. Im schräg auffallenden Licht einer Mikroskopierlampe konnte der Zeitpunkt des Stillstandes der Cilientätigkeit bestimmt werden.

Die Einstellung der Cilientätigkeit, ein Charakteristikum des Zelltodes, erfolgte aber niemals bei allen *Paramecien* zu gleicher Zeit, sondern es ergaben sich, besonders in den niedrigeren Konzentrationen, oftmals Differenzen in der Lebensdauer. Zur Verminderung des hierdurch bedingten Versuchsfehlers wurde der Zeitpunkt gewählt, zu dem etwa drei Viertel der Individuen ihre Cilientätigkeit eingestellt hatten.

V Versuchsergebnisse:

Penicillin

Konzentration: 4200—15.000 IE/cm³

Wie aus dem Kurvendiagramm (Abb. 1) hervorgeht, besteht in diesem Bereich eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Antibiotikums und der Lebensdauer der Zellen.

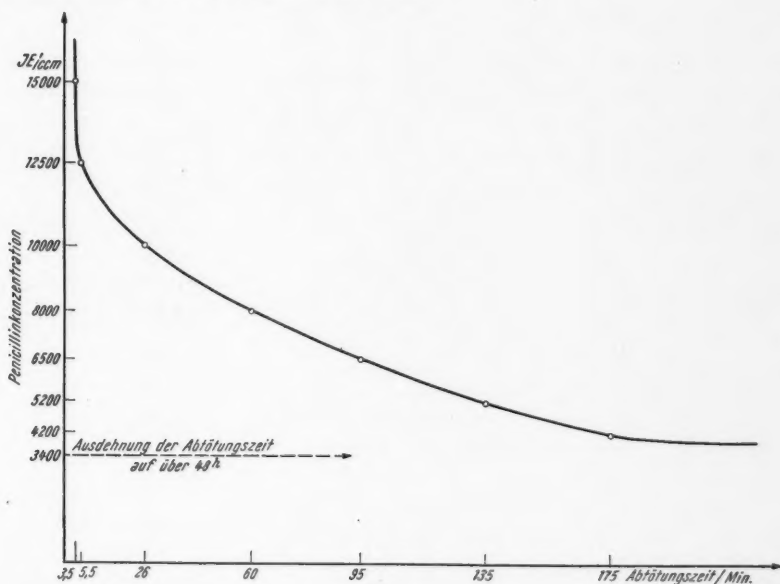


Abb. 1.

Unterhalb 4200 IE/cm³ erfolgte ziemlich unvermittelt eine starke Ausdehnung der Lebensdauer von 175 Minuten bei 4200 IE/cm³ auf über 48 Stunden bei 3400 IE/cm³, wodurch der stärker letale Bereich abgegrenzt ist.

Konzentration: 50—1500 IE/cm³

Das Versuchsergebnis ist in der Tab. 1 dargestellt.

In der ersten senkrechten Spalte sind die Penicillinkonzentrationen angegeben. Darunter stehend bedeuten Ko_I, Ko_{II} und Ko_{III} die Kontrollen.

Die zweite senkrechte Spalte enthält die Anzahl der pro Kultur eingesetzten *Paramaecien*, während in der letzten Spalte die Anzahl der nach 96 Stunden ausgezählten *Paramaecien* angegeben ist.

Das Wachstum der Penicillinkulturen wurde alle 24 Stunden mit dem der Kontrollen verglichen und die Schätzwerte durch Kreuze vermerkt. So zeigt z. B. die Spalte 3 für die Kontrollen je 2 Kreuze, für die Penicillinkulturen — bis auf die oberste waagerechte Spalte — je 1 Kreuz, d. h. in den betreffenden Penicillinkulturen ergab die Schätzung deutlich geringere Individuenzahlen als in den Kontrollkulturen. Das Zeichen — in der obersten Querspalte bedeutet: keine Teilung, das Zeichen \rightarrow : Kultur abgestorben.

Tabelle 1.

Penicillin IE/cm ³	Eingesetzte <i>Paramaecien</i>	24h	48h	72h	96h
1500	5	—	\rightarrow		
1250	5	+	+ +	+ + +	3900
1000	5	+	+	+ + +	3110
800	5	+	+	+ + +	3450
600	5	+	+ +	+ + + +	4100
400	5	+	+ +	+ + + +	3600
200	5	+	+ +	+ +	1250
100	5	+	+ +	+ +	1020
50	5	+	+ +	+ +	620
Kor	5	+ +	+ +	+ +	600
KoII	5	+ +	+ +	+ +	1050
KoIII	5	+ +	+ +	+ +	870

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, bewirkte das Penicillin in dem Bereich von 400 bis 1250 IE/cm³ gegenüber den Kontrollen eine deutliche Teilungsförderung, obwohl der Gehalt an Futterorganismen in den Penicillinkulturen nicht höher war als in den Kontrollkulturen. Das Antibiotikum hemmte anfangs die Zellteilung und entfaltete erst nach etwa 48 Stunden seine teilungsfördernde Wirksamkeit.

Charakteristisch für die Penicillinwirkung ist der unmittelbare Übergang von der Teilungsförderung zum Zelltod. Es fehlt also der sogenannte cytostatische Wirkungsbereich, d. h. derjenige Bereich, in dem die Zellteilung über längere Zeit gehemmt ist.

Ergänzende Versuche mit *Paramaecium bursaria* erbrachten folgendes: Dieses Ciliat besitzt eine geringere Penicillinresistenz als *P. caudatum*. Es lebte in einer Lösung von 2500 IE/cm³ nur 15 Minuten und in einer von 1500 IE/cm³ 90 Minuten.

Unterhalb einer Konzentration von 500 IE/cm³ gelang auch mit diesem Objekt der Nachweis einer Teilungsförderung. Diese kam besonders bei ausnahmsweise hohen Versuchstemperaturen (im Mittel = 29° C) zum Ausdruck. Das in der Tab. 2 dargestellte Versuchsergebnis erweckt den Eindruck einer durch Penicillin gesteigerten Wärmeresistenz. Es ist aber eher anzunehmen, daß die erhöhte Teilungserregung eine bei höherer Temperatur schneller vor sich gehende Intoxikation der Zelle verhindert.

Trotz der hohen Temperatur besaßen die Protozoen eine überdurchschnittliche Größe.

Tabelle 2.

Penicillin IE/cm ³	Eingesetzte Paramecien	24h	48h	72h	120h
250	5	+	87	+	345
200	5	+	21	+	60
150	5	+	22	+	80
50	5	+	8	+	15
KoI	5	—	1	—	—
KoII	5	—	2	—	—

Streptomycin (CaCl₂-Komplex)

Konzentration: 12—40 mg/cm³

Es ergab sich eine im Prinzip gleiche Absterbekurve, wie sie auch bei der Einwirkung hoher Penicillinkonzentrationen zu verzeichnen war (vgl. Abb. 1). Auch hier war der stark letale Bereich dadurch deutlich begrenzt, daß bei 9 mg/cm³ die Lebensdauer der Paramecien auf über 20 Stunden anstieg, während sie bei 12 mg/cm³ nur etwa 150 Minuten betrug.

Konzentration: 0,1—3 mg/cm³

Die Tab. 3 gibt einen Überblick über den Wirkungsverlauf.

Zwischen 2,5 und 0,4 mg/cm³ war die Zellteilung vollständig gehemmt. Unterhalb dieses cytostatischen Bereiches (von 0,1 bis

Tabelle 3.

Streptomycin mg/cm ³	Eingesetzte Paramecien	24h	48h	72h	96h
3,0	5	—	—	—	—
2,5	5	—	—	—	—
2,0	5	—	—	—	5
1,6	5	—	—	—	5
1,2	5	—	—	—	5
0,8	5	+	—	—	12
0,4	5	+	+	+	2560
0,2	5	+	+	+	3120
0,1	5	+	+	+	1860
KoI	5	+	+	+	648
KoII	5	+	+	+	680
KoIII	5	+	+	+	618

0,4 mg/cm³) bewirkte das Streptomycin eine deutliche Förderung der Teilungsrates. Die Teilungsförderung trat, wie auch beim Penicillin festgestellt werden konnte, erst nach etwa 48 Stunden zutage. Da die Entwicklung der Bakterienflora in dem Bereich der Teilungsförderung ge-

ringer war als in den Kontrollkulturen, handelt es sich um eine direkte Teilungsförderung durch das Antibiotikum.

Paramaecium bursaria war auch gegenüber Streptomycin weniger resistent als *P. caudatum*. Durch 9 mg/cm^3 wurde es bereits nach 5 Minuten und durch 3 mg/cm^3 nach 20 Minuten abgetötet. Eine Teilungsförderung war nicht zu verzeichnen.

Chloronitrit

Konzentration: $1\text{--}5 \text{ mg/cm}^3$

Dieses Antibiotikum besitzt eine viel höhere Wirksamkeit als Penicillin und Streptomycin. Der stark letale Bereich begann schon ab 1 mg/cm^3 . Z. B. lebten die Paramaecien in einer Lösung von 3 mg/cm^3 etwa 150 Minuten, und durch 5 mg/cm^3 wurden sie schon nach 2,5 Minuten abgetötet.

Konzentration: $5\text{--}300 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

Tabelle 4.

Chloronitrit γ/cm^3	Eingesetzte Paramaecien	24h	48h	72h	96h
300	2		—	—	
200	2				
150	2				20
125	2				19
100	2				20
80	2				12
40	2				33
20	2				186
10	2				665
5	2				2750
KOI	2				ca. 4000
KOII	2				ca. 4000

Da das Chloronitrit die Entwicklung von *E. coli* in der verdünnten Bouillon zu stark hemmte, kam das Hefemedium zur Anwendung.

Der Wirkungsverlauf ist in der Tab. 4 beschrieben.

Unterhalb $200 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ setzte eine starke Teilungshemmung ein, die jedoch, zum Unterschied von Streptomycin, allmählich mit sinkender Konzentration aufgehoben wurde.

Unterhalb $5 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ trat keine Teilungsförderung auf.

Allerdings ist das Hefemedium wegen seines Gehaltes an Wuchsstoffen für Untersuchungen über die teilungsfördernden Eigenschaften einer Substanz wenig geeignet. Wie die Tab. 4 angibt, hatten sich die Kontrolltiere in dem Hefemedium sehr stark vermehrt, was sicherlich auf eine Teilungsförderung durch die Hefe zurückzuführen ist. Wenn trotzdem eine sehr starke Teilungshemmung durch Chloronitrit vorlag, dann spricht dies für die hohe cytostatische Wirksamkeit des Antibiotikums.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß selbst im Bereich der sehr starken Teilungshemmung der gleiche Gehalt an Futterorganismen (*B. subtilis*) zu verzeichnen war wie in den Kontrollkulturen.

Xanthocillin XKonzentration: 2,5—100 γ/cm^3

Dieses Antibiotikum übertraf in seiner Wirkungsstärke noch das Chloronitrin. Wie aus dem oberen Abschnitt der Tab. 5 zu ersehen ist, begann der stark letale Bereich schon ab 5 γ/cm^3 . Schwankungen der Mortalitätszeiten, wie sie allgemein bei den untersuchten Antibiotica auftraten, machten sich beim Xanthocillin ganz besonders bemerkbar und erschwerten selbst die Festlegung einigermaßen angenäherter Werte. Es ist dies wahrscheinlich auf die Wasserunlöslichkeit von Xanthocillin zurückzuführen (s. S. 6, Fußn. 1).

Über die Wirksamkeit von 2,5—20 γ/cm^3 orientiert der untere Tabellenteil.

Tabelle 5.

Xanthocillin X γ/cm^3		Abtötung nach			
100—50		30 bis 35 Min.			
40—20		110 bis 180 Min.			
10		200 bis 240 Min.			
5		22 bis 24 Stunden			

Xanthocillin X γ/cm^3	Eingesetzte Paramaecien	24 h	48 h	72 h	96 h
20	2	—			
10	2		—		
7	2				250
5	2				510
2,5	2				1580
KoI	2				1410
KoII	2				1320

Die Kultivierung der Paramaecien erfolgte wieder in dem Hefemedium. Ein Vergleich beider Tabellenteile zeigt, daß die Hefe einen Wirkungsabfall des Antibiotikums verursachte.

In allen Konzentrationsstufen war, ebenso wie beim Chloronitrin, eine reiche und fast reine Bakterienflora (*B. subtilis*) vorhanden.

Der cytostatische Wirkungsbereich war nicht immer ganz deutlich ausgeprägt².

So viel kann aber gesagt werden, daß die toxische Wirksamkeit stark überwiegt.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß bei vielen Bakterien eine Wachstumsförderung durch Penicillin, Streptomycin und andere Antibiotika in unerschwelligen Konzentrationen festgestellt worden ist (v. Holt 1952, weitere Literaturangaben s. daselbst).

² Eine Teilungsförderung durch die Hefe trat in diesen Versuchsserien nicht deutlich zutage (vgl. die Kontrollen der Tab. 5), so daß eine Kompensierung der teilungshemmenden Eigenschaft des Antibiotikums durch die Hefe nicht stattfand.

b) Der Wirkungsverlauf der Antibiotika in Abhängigkeit vom pH

Versuchsführung:

Nach der Vorschrift von Sørensen wurden 1/15 mol. Phosphatpufferlösungen mit einem pH von 4,49 bis 9,18 hergestellt und danach auf 1/45 mol. verdünnt. Bei einer noch weiteren Verdünnung des Puffers erfolgte eine zu rasche Verschiebung des pH zur alkalischen Seite.

Vorversuche mit den 1/45 mol. Pufferlösungen ohne Zusatz von Antibiotika erbrachten folgende Ergebnisse:

In Pufferlösungen mit einem pH von 4,49 bis 7,16 lebten die Paramaecien noch nach 72 Stunden, ihre Körperform und Bewegung war normal. Bei einem pH von 7,55 waren nach 22 Stunden 25% der Tiere abgestorben; die übrigen lebten noch nach 72 Stunden, ihre Körperform war normal, die Bewegung etwas verlangsamt.

Bei einem pH von 8,04 erfolgte der Zelltod nach 19 bis 20 Stunden und bei einem pH von 9,18 nach 2,5 bis 5 Stunden.

Danach beruhte der Versuchsfehler nicht auf einer zu hohen Konzentration des Puffers, sondern auf seiner hohen Alkalität (ab pH 8,04).

V Versuchsergebnisse:

Penicillin (2500 IE/cm³) entfaltete seine stärkste Wirksamkeit in einem pH-Bereich von 4,49 bis 6,81:

Tabelle 6.

pH	4,49	5,28	5,9	6,46	6,81	7,16	7,55	8,04	8,67	9,18
Abtötungszeit/Min.	7				10	50	60	160	130	80

Beim **Streptomycin** war keine eindeutige Abhängigkeit der Wirkung vom pH festzustellen.

Chloronitrim (1000 γ /cm³) entfaltete seine stärkste Wirksamkeit beiderseitig des Bereiches von pH 6,46 bis 7,16:

Tabelle 7.

pH	4,49	5,28	5,9	6,46	6,81	7,16	7,55	8,04	8,67	9,18
Abtötungszeit/Min	60		109	150			120	80	70	38

Xanthocillin X ließ einen deutlichen Wirkungsanstieg im alkalischen Bereich erkennen (ab pH 7,55):

Tabelle 8.

pH	4,49	5,28	5,9	6,46	6,81	7,16	7,55	8,04	8,67	9,18
Abtötungszeit/Min	30		50	70	130	100	15	6	5	4,5

Cytomorphologische Untersuchungen

Penicillin (4200 IE/cm³)

Unmittelbar nach dem Einbringen in die Penicillinlösung führten die *Paramecien* mäßige bis lebhaftere Fluchtbewegungen aus. Nach dieser Periode, die nur kurze Zeit dauerte, war die Schwimmbewegung wieder normal und eine Zeitlang an den Protozoen keine Veränderung wahrzunehmen.

Etwa nach dem ersten Drittel der Abtötungszeit setzte eine kontinuierliche Volumzunahme ein. Dadurch, daß das Hinterende in der Regel stärker anschwell, erhielten die Zellen zunächst ein gleichmäßig-eiförmiges Aussehen. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Schlagfrequenz der Cilien merklich abgesunken, und ihr Schlagrhythmus wurde immer unregelmäßiger.

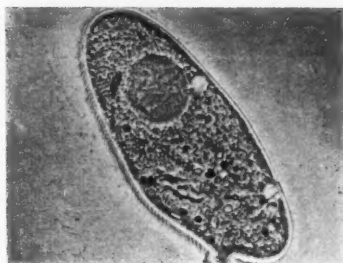


Abb. 2.

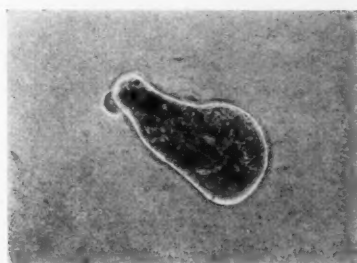


Abb. 3.

Die Pulsationsfrequenz der pulsierenden Vakuolen verzögerte sich ebenfalls, aber nicht proportional mit der Volumzunahme. Die Zeiten zwischen den Pulsationen der einzelnen Vakuolen wurden unterschiedlicher, und auch das Zuführungssystem arbeitete immer fehlerhafter. Schließlich weiteten sich die Vakuolen auf das Drei- bis Fünffache ihres ursprünglichen Durchmessers aus und stellten ihre Tätigkeit ein.

Durch den starken Wassereintritt geriet die Bewegung des Protoplasmas völlig in Unordnung. In unregelmäßigen Zeitabständen erfolgte eine kräftige Durcheinanderwirbelung des Plasmas mitsamt seinen Einschlüssen, währenddessen die *Paramecien* eine flotte Rotationsbewegung am Ort durchführten.

Selbst in dem maximalen Schwellungsstadium besaßen die Zellen eine erhöhte Durchsichtigkeit.

Auffällige morphologische Veränderungen der Plasmacinschlüsse konnten nicht wahrgenommen werden; lediglich hatte der Makronukleus eine kugelige Form angenommen und war durch die temporären heftigen Plasmabewegungen oft verlagert worden (Abb. 2).

Kurze Zeit vor dem Zelltod nahmen die *Paramecien* ein unregelmäßig-birnförmiges Aussehen an (Abb. 3). Die Pellicula wies lokale Aus-

beulungen auf und riß bald an den ausgebeulten Stellen auf, so daß das Plasma in Form von rundlichen und sich stark vergrößernden Blasen nach außen trat (Abb. 4). Während dieses Vorganges flimmerten die Cilien noch.

Die durch das Antibiotikum verursachte große Durchsichtigkeit der Zellen ließ die Chromosomen in aller Deutlichkeit hervortreten. Niemals konn-

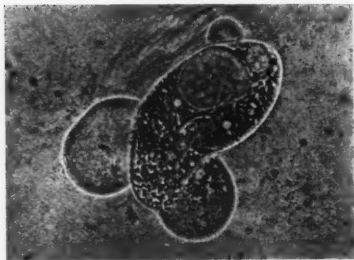


Abb. 4.

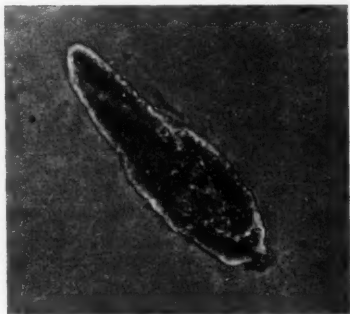


Abb. 5.

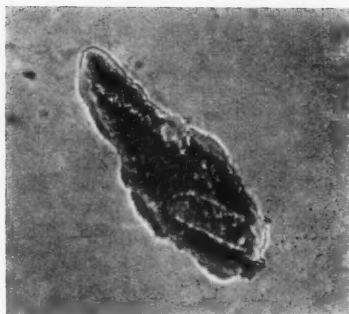


Abb. 6.

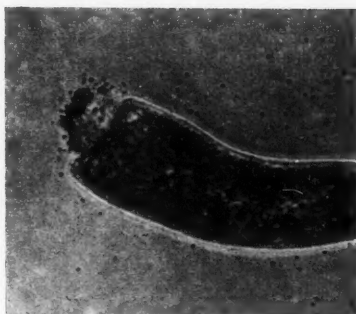


Abb. 7.

ten an ihnen, selbst unmittelbar vor dem Zelltod, irgendwelche morphologische Veränderungen wahrgenommen werden.

Zur Ergänzung dieser Ergebnisse wurde die Wirkung von Penicillin auch an anderen Ciliatenarten geprüft:

Bei *Spirostomum ambiguum* bewirkte eine letale Penicillinkonzentration (2500—4000 IE/cm³) nach wenigen Minuten den Verlust der geschmeidigen Bewegung. Das dünne und lange Vorderende krümmte sich hakenförmig und begann sich mehrfach abzuknicken. Eine Volumzunahme trat nicht besonders deutlich in Erscheinung. Auffälliger war eine zunehmende Unregelmäßigkeit der Zellkonturen, die besonders bei der Kontraktion der Zelle deutlich wurde (Abb. 5 und 6). Oft kam es vor, daß bei

der Kontraktion die Pellicula am hinteren Ende aufriß. An dieser Stelle kam es dann in Abständen von einer bis mehreren Minuten zu einem schubweisen Ausstoßen einzelner Plasmaportionen und nicht selten sogar zu einem stückweisen Abreißen ganzer Teile des Zellkörpers. Die Randzone solcher Abrißstellen war unregelmäßig gezackt und klappte auseinander (Abb. 7). Daß es trotz dieser großen Wundfläche nicht zu einem kontinuierlichen Plasmaausfluß kam, lag offenbar an der Bildung einer temporären Niederschlagsmembran an der Grenze Entoplasma—Penicillinlösung.

Die Eindrücke, die durch dieses Objekt vermittelt wurden, verstärken die Vermutung, daß Penicillin nach genügend langer Einwirkungsdauer die Membranplastizität erhöht.



Abb. 8.

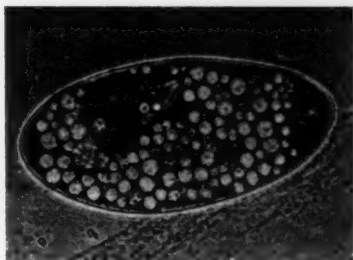


Abb. 9.

Stylonychia mytilus war gegenüber Penicillin widerstandsfähiger als *Paramecium caudatum*. Wurden beide Protozoenarten gemeinsam in eine Penicillinlösung übergeimpft, in der die *Paramecien* nach etwa 3 Stunden starben, dann lebte *Stylonychia* noch nach 24 Stunden. Die Tiere waren dann kugelförmig aufgetrieben und platzten bei geringem Deckglasdruck.

Stylonychia besitzt eine abgeplattete Körperform. Der Übergang von der abgeplatteten Form, die ein System von Stützfilbrillen oder ähnliche stabilisierende Elemente voraussetzt, in die Kugelform erfordert einen höheren Binnendruck. Entsprechend diesem höheren Binnendruck muß die Wasserpermeabilität der Zellmembran eine Steigerung erfahren, die dadurch zustande kommen könnte, daß sich Penicillin in der Zellmembran besonders stark anreichert. Vielleicht erklärt sich auf diese Weise die hohe Penicillinresistenz von *Stylonychia*.

In dem weniger stark letalen Konzentrationsbereich von
1500 bis 2000 IE/cm³

verursachte das Penicillin folgende morphologische Veränderungen:

Nach 48stündiger Züchtungsdauer besaß die Mehrzahl der *Paramecien*

Vakuolen mit ganz geringen Einschlüssen. Ihrem Entstehungsorte nach handelte es sich um „Nahrungsvakuolen“. Ihre Ablösung vom Cytopharynx erfolgte schneller und unter geringfügigerer Längsstreckung, als es normalerweise der Fall ist. Später vereinigten sich diese Vakuolen gewöhnlich zu einer besonders großen Vakuole (Abb. 8). Das Ineinanderfließen der Vakuolen erfolgte ziemlich spontan, nach vorherigem geringem Berührungsdruk.

Hin und wieder gelang es, die Parameccien länger als 48 Stunden zu züchten. Das Plasma solcher Tiere war dann von einer großen Menge kleinster bis größerer im Phako hell und inhaltlos erscheinenden Bläschen erfüllt (Abb. 9). Zum Unterschied von den eben beschriebenen „Nahrungsvakuolen“ waren diese Bläschen im Plasma entstanden.

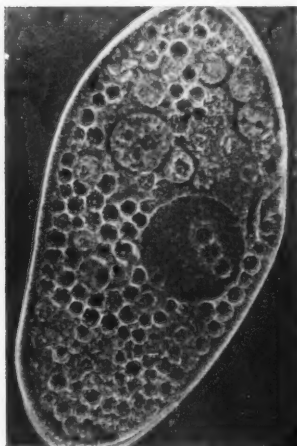


Abb. 10.

Diese Zustandsänderung des Plasmas, die als Plasmavakuolisierung bezeichnet wird, wird keineswegs nur durch Penicillin hervorgerufen. Z. B. konnte Spek (1924) durch Einwirkung von Neutralsalzen bei verschiedenen Protozoen eine Plasmavakuolisierung hervorrufen. Der Autor macht darauf aufmerksam, daß die Plasmavakuolisierung bei den Protozoen nichts Pathologisches darstellt. In der Tat verschwanden selbst bei extrem vakuolisierten Penicillintieren die Bläschen sehr bald, wenn die Tiere in penicillinfreies Medium zurückversetzt wurden. Nach 24 bis 48 Stunden stellte sich auch die normale Teilungsrate wieder ein.

Von einiger Bedeutung für die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Penicillin und darüber hinaus für den Mechanismus der Nahrungsvakuolenbildung erwies sich das Ergebnis der folgenden Versuchsserie:

In einer Penicillinkonzentration von 1250 bis 1500 IE/cm³ hatte sich *E. coli* ganz überraschend gut vermehrt.

Die Parameccien, die eine normale Teilungsrate aufwiesen, waren auffällig voluminös. Die Kontrolle der Penicillintiere ergab nach 72 bis 96 Stunden Züchtungsdauer eine so außerordentlich große Zahl prall gefüllter Nahrungsvakuolen, wie sie sonst niemals beobachtet werden konnte (Abb. 10).

Diese abnorm hohe Zahl von Nahrungsvakuolen spricht für eine durch Penicillin herabgesetzte Oberflächenspannung am Ort der Nahrungsvakuolenbildung. Als Folge der Erniedrigung der Oberflächenspannung findet nämlich eine erleichterte Einbuchtung des Entoplasmas am Grunde des Cytopharynx durch den Wimperstrom statt, so daß die Bildung und Abschnürung der Vakuole schneller vor sich geht. Es sei in diesem Zusammenhang nochmals darauf hingewiesen, daß selbst

in einer Penicillinlösung, die nur wenig Bakterien enthielt, Leervakuolen in rascher Folge und unter geringerer Längsstreckung, als es normalerweise der Fall ist, am Grunde des Cytopharynx abgeschnürt wurden (s. S. 16 oben). Gerade die Bildung solcher Leervakuolen in der partikelarmen Penicillinlösung zeigt, daß die Nahrungsvakuolenbildung wenigstens teilweise auf Grenzflächenkräfte zurückzuführen ist (s. S. 25).

Die Vermutung, daß Penicillin die Oberflächenspannung herabsetzt, machte eine Messung der Oberflächenspannung von Penicillinlösungen auf physikalischem Wege notwendig. Mittels einer empfindlichen Torsionswaage konnte nach der Ringabreißmethode tatsächlich eine Herabsetzung der Oberflächenspannung durch Penicillin festgestellt werden. So ernie-

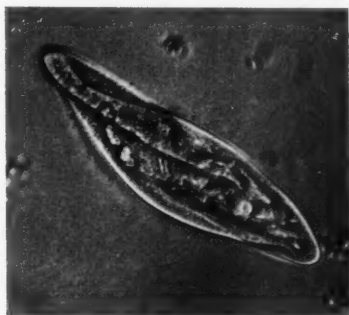


Abb. 11.

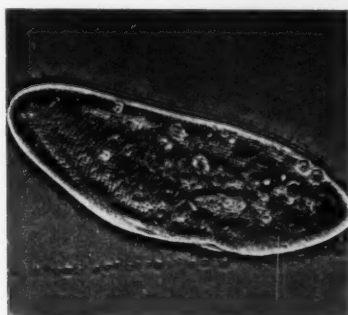


Abb. 12.

drigte Penicillin bereits in einer Konzentration von 500 IE/cm^3 die Oberflächenspannung um 7,7%, und 1250 IE/cm^3 verursachten eine Herabsetzung der Oberflächenspannung um 13,2%. Ein weiterer Anstieg der Konzentration änderte diesen Wert nicht.

Auffällig war an den *Paramecien* dieser Versuchsserie ferner, daß sie größtenteils überhaupt keine Exkretkörner besaßen. Es ist naheliegend, diesen Umstand auf das Vorhandensein der enorm hohen Zahl von Nahrungsvakuolen zurückzuführen; denn es war dies der einzige Fall, in dem unter dem Einfluß von Penicillin ein Schwund der Exkretkörner auftrat.

Streptomycin (CaCl_2 -Komplex), 8 bis 10 mg/cm^3 .

Nach dem Abklingen der anfänglichen mäßigen Fluchtbewegung schwammen die *Paramecien* eigentümlich monoton und schnell.

Während des schnellen Schwimmens machte sich eine *Schrumpfung* zunächst am Hinterende bemerkbar, die dann aber bald auf die gesamte Zelle übergriff (Abb. 11). Die Schrumpfung führte zu einer Hemmung des Cilienschlages; jedoch waren die Tiere noch im maximalen Schrumpfungszustand befähigt, sich langsam schwimmend vorwärts zu bewegen. Die *Paramecien* verharreten noch eine Zeitlang in dem maximalen Schrumpfungszustand, wobei ihre Oberfläche eine runzelige Beschaffenheit annahm.

Die Tätigkeit der pulsierenden Vakuolen war schon zu Beginn der Schrumpfungsphase gehemmt und kam mit der fortschreitenden Schrumpfung allmählich völlig zum Erliegen. In der Regel waren beide Vakuolen dann fast ganz geschlossen.

Etwa im ersten Drittel der Schrumpfungsphase verzögerte sich die Bildung der Nahrungsvakuolen. Diese waren unmittelbar nach ihrer Ablösung vom Cytopharynx meist langgestreckt und sichelförmig und rundeten sich nur langsam und oft unvollständig ab.

Nach der maximalen Schrumpfung setzte eine sekundäre Volumzunahme ein.

Der steigende Binnendruck dehnte und glättete die schrumpelige Pel-

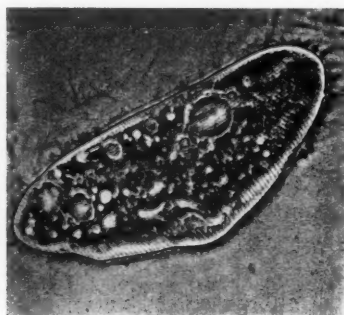


Abb. 13.

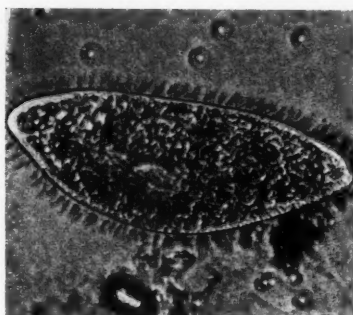


Abb. 14.

licula, ohne daß jedoch die Durchsichtigkeit derselben zunahm. Die Pelli-
cularleisten blieben noch in aller Deutlichkeit sichtbar, und die Umriß-
linie der Zelle war scharf gezeichnet (Abb. 12).

Mit dem Beginn der Wasseraufnahme erfolgte eine Belebung des Cilienschlages und hiermit eine gesteigerte Beweglichkeit der Paramecien. Auch stellte sich oftmals wieder eine langsame Vakuolentätigkeit ein. Der Wassereintritt überstieg jedoch das Normalmaß (Abb. 13), so daß die geringe Zelltätigkeit wieder zum Stillstand kam.

Nur bei wenigen Individuen kam es zu einem lokalen Austritt von Protoplasmatropfen. Die Langsamkeit, mit der diese sich vergrößerten, erweckte den Eindruck einer gesteigerten Viskosität des Plasmas. Dieser Eindruck trug aber, denn wenn die den austretenden Plasmotropfen umgebende Haptogenmembran aufriß, ergoß sich dünnflüssiges Plasma spontan in das Außenmedium. Diese Feststellung deutet darauf hin, daß Streptomycin nur die oberflächlichen Plasmakolloide beeinflußt (dehydratisiert).

Erst unmittelbar nach dem plötzlichen Stillstand der Cilientätigkeit drang das Antibiotikum in das Zellinnere und verursachte eine Ausfällung der gesamten Plasmakolloide, so daß die Zelle völlig undurchsichtig wurde (Abb. 14).

Streptomycin-Hydrochlorid erwies sich gegenüber *Paramecium caudatum* wirksamer als Streptomycin-Calciumchlorid. 7 mg/cm³ bewirkten eine extreme Schrumpfung; der Zelltod erfolgte ohne eine vorhergehende Volumzunahme. In einer Konzentration von 5 mg/cm³ folgte auf die immer noch deutliche Schrumpfung eine sekundäre pathologische Volumzunahme. Die Durchsichtigkeit der Paramecien wurde durch das Hydrochlorid-Salz nicht so stark herabgesetzt, so daß festgestellt werden konnte, daß die Geschwindigkeit der Plasmaströmung auch kurz vor dem Zelltod nicht merklich verändert war; auch schien der Makronukleus unverändert. Diese Beobachtungen stützen die schon vorstehend geäußerte Vermutung, daß Streptomycin nur die oberflächlichen Kolloide beeinflusst.

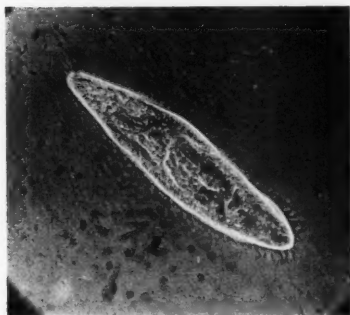


Abb. 15.

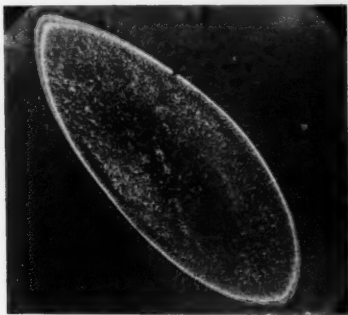


Abb. 16.

Streptomycin (CaCl_2 -Komplex) verursachte im cytostatischen Bereich (0,8—2,5 mg/cm³) folgende Veränderungen:

Nach 72 Stunden Züchtungsdauer besaßen die Streptomycintiere ein bedeutend geringeres Volumen als die Kontrolltiere (Abb. 15 zeigt ein mit Osmiumsäure fixiertes Streptomycintier und Abb. 16 ein ebenso fixiertes Kontrolltier).

Die Paramecien schwammen recht langsam, was z. T. an der Verminderung des Cilienbestandes lag. Der Zellkörper ließ seine normale Geschmeidigkeit vermissen, er wirkte starr. Offenbar lag dies an der stark dehydrierten Zellmembran.

Beide pulsierende Vakuolen arbeiteten nur noch träge und unregelmäßig.

Keines der Tiere enthielt Nahrungsvakuolen. Wurden die Tiere in eine Karminaufschwemmung übertragen, dann nahmen sie selbst nach eintägigem Aufenthalt in derselben nicht die geringste Menge Farbstoffpartikeln auf. Dieser Versuch zeigt ebenfalls die bedingte Abhängigkeit der Nahrungsvakuolenbildung von dem Vorhandensein geformter Partikeln. Übereinstimmend mit diesem Versuch ist das Ergebnis der physikalischen Prüfung der Oberflächenspannung von Streptomycinlösungen: Es ergab sich keine Herabsetzung der Oberflächenspannung, auch nicht in sehr stark letalen Streptomycinlösungen.

Auffällig war ferner, daß trotz der Starrheit des Zellkörpers das Plasma noch langsam rotierte.

Das Plasma enthielt neben einer großen Anzahl kleiner bis sehr großer Exkretkristalle viele stark lichtbrechende Tropfen (Abb. 17). Über diese Tropfen folgt am Ende dieses Versuchsabschnittes eine zusammengefaßte Darstellung.

Der Makronukleus war meistens vergrößert und wies mannigfaltige Formveränderungen auf.

Das Plasma von Zellen, die sich kurz vor dem Zelltod befanden, war immer außerordentlich stark vakuolisiert. In diesem Zustand waren die Zellen bereits pathologisch aufgetrieben.

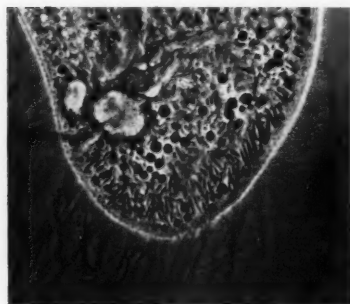


Abb. 17.

Zusammenfassend kann über die Vergrößerung und Formveränderung der Makronuklei unter dem Einfluß von Streptomycin folgendes mitgeteilt werden:

Die Makronuklei, die auf das Zweibis Dreifache ihres ursprünglichen Volumens angewachsen waren, hatten bei Individuen, die unmittelbar vor dem Zelltod standen, Kugelform; sonst waren sie sehr lang gestreckt, unregelmäßig gelappt, zeigten Knospenbildung oder waren in zwei bis mehrere ungleiche Teilstücke zerfallen. Am extremsten traten diese Kernveränderungen bei den Paramaecien von

Klon A zutage. Die Skizzen der Abb. 18 veranschaulichen solche typische Kernveränderungen, wie sie bei den Individuen dieses Klons regelmäßig unter der Einwirkung von Streptomycin auftraten.

Hierzu ist zu bemerken, daß die Paramaecien von Klon A keinen Mikronukleus besaßen. Vielleicht hängt dieser Umstand irgendwie mit der besonders großen Ansprechbarkeit der Makronuklei auf Streptomycin zusammen.

Der Brechungsindex der veränderten und vergrößerten Kerne stimmt mit dem von Normalkernen überein, so daß es sich nicht einfach um eine Aufblähung der Kerne handeln konnte.

Schon die üblichen Kernfärbungen mit Karminessigsäure, Kernerchtrot, Methylgrünessigsäure und Haemalaun deuteten auf das Vorhandensein überdurchschnittlicher Chromatinmengen hin. (Abb. 19 und 20 zeigen mit Haemalaun gefärbte Makronuklei.) Die endgültige Bestätigung über das Vorhandensein überdurchschnittlicher Mengen an Thymonukleinsäure erbrachte die Feulgensche Nuklealreaktion (Abb. 21). Leider waren die Paramaecien von Klon A bereits vor der Anwendung dieser Methode abgestorben.

Wenn von einem Zuwachs an Thymonukleinsäure gesprochen wird, dann muß selbstverständlich das Verhältnis von Kernvolumen zu Zellvolumen

berücksichtigt werden. Dadurch, daß Streptomycin auch eine Verringerung der plasmatischen Substanz verursacht, kann ein Kernwachstum vorge-
täuscht werden, falls kein adäquater Kernabbau erfolgt. Allem Anschein nach kommt die Vergrößerung der Kerne sowohl durch eine Hemmung des Chromatinabbaues als auch durch eine verstärkte Einlagerung plasmatischer Substanzen in den Kern zustande.

Bemerkenswert ist, daß *Paramecien*, die mehrere Tage in dem Hefemedium mit einem Streptomycingehalt von 2 mg/cm^3 kultiviert wurden, nur selten veränderte Makronuklei aufweisen.

Die Resistenz der Protozoen schien überhaupt durch die Hefezellen gesteigert. Sie enthielten prall gefüllte Nahrungsvakuolen und stimmten auch sonst morphologisch völlig mit den Normaltieren überein. Allerdings teilten sich die *Paramecien* innerhalb von 96 Stunden nur ein- bis zweimal.



Abb. 18.



Abb. 19.



Abb. 20.

Es wäre möglich, daß die B-Vitamine der Hefe eine Resistenzsteigerung hervorrufen. Vielleicht beruht die Verringerung der Streptomycinwirkung auch auf dem hohen Ribonukleinsäuregehalt der Hefe; denn es ist bekannt, daß Streptomycin durch Nukleinsäuren ausgefällt wird. Solche unlöslichen Komplexe können dann wirkungsverzögernd sein (s. Vogel, S. 217, 1951; Klossa, S. 216, 1952).

Versuche, den Schädigungsgrad der mit Streptomycin behandelten *Paramecien* auf fluoreszenzoptischem Wege kenntlich zu machen, verliefen negativ. So wurde Acridinorange in einer Konzentration von $1 : 100.000$ nach 20 Minuten vom Plasma und den plasmatischen Strukturen der mit Strepto-

mycin behandelten Paramaecien genau so stark gespeichert wie von Normaltieren. Der einzige Unterschied bestand in dem Vorhandensein einer viel zahlreicheren leuchtend kupferrot fluoreszierenden Granula im Plasma der Streptomycintiere. Es handelte sich um die stark lichtbrechenden Tropfen (s. S. 20 oben), die von allen Zellstrukturen das Acridinorange am stärksten speicherten.

Chloronitrin (1 mg/cm³)

Die Paramaecien führten anfangs ziemlich unruhige Fluchtbewegungen aus. Doch schon frühzeitig trat eine zunehmende Verlangsamung der Bewegungen und in besonders auffälliger Weise ein rapides Absinken der Tätigkeit beider pulsierender

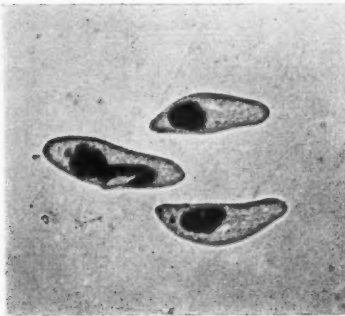


Abb. 21.

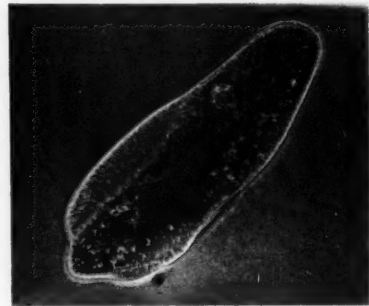


Abb. 22.

Vakuolenzutage. Diese nahmen bald die Gestalt großer Flüssigkeitsblasen an und verharteten endgültig in diesem Zustand.

Ohne Anzeichen einer Formveränderung legten sich die Paramaecien auf den Grund und rotierten träge. Von diesem Zeitpunkt an wurden sie zunehmend voluminöser und verloren massenhaft ihre Cilien.

Der massenhafte Abwurf der Cilien kam durch die starke Quellung ihrer Basalkörner zustande.

(In bezug auf die Bezeichnung Basal„korn“ erscheint mir folgender Einwand notwendig: In der Literatur wird als Basalkorn ein an der Basis der Cilie liegendes Gebilde bezeichnet. Im Phako erscheint es bei normalen Paramaecien als sehr wenig lichtbrechend, es ist oval und enthält zwei polar liegende stark lichtbrechende Körperchen, die sich mit basischen Vitalfarbstoffen anfärben. Das ganze Gebilde ist von einer stark dehnbaren Membran umgeben. Auf Grund dieser Feststellungen halte ich die Bezeichnung Basal„bläschen“ für treffender.)

Die stark gequollenen Basalbläschen der Cilien wurden allmählich von dem nur träge fließenden Plasma fortgeschwemmt und erfüllten in großer Zahl das Zellinnere. Die klebrige Beschaffenheit der Bläschenmembran führte zur Aggregatbildung.

Auffällig war, daß bald nach dem massenweisen Eintre-

ten der gequollenen Cilienbläschen in das Entoplasma die stark lichtbrechenden Tropfen auftraten. Es bestand offenbar ein Zusammenhang zwischen den basalen Cilienbläschen und den stark lichtbrechenden Tropfen.

Schon zu Beginn der Lähmung der Schwimmbewegung und der Vakuolenpulsation machte sich eine Trübung des Plasmas bemerkbar, die durch eine Ausfällung auch der tiefer liegenden Plasmakolloide hervorgerufen wurde.

Das Antibiotikum verursachte eine Ausfällung der Thymonukleinsäure im Makronukleus und eine Verklumpung der Chromosomen.

Die zunehmende Plasmaausfällung führte zu einem Stillstand der

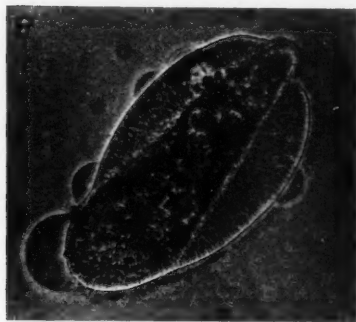


Abb. 23.

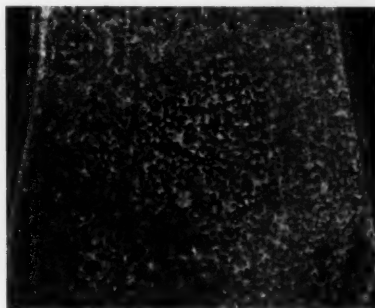


Abb. 24.

Plasmaströmung. Daß die Tiere lebten, war nur noch an der Bewegung vereinzelt stehender Cilien zu erkennen. (Wie spätere Untersuchungen zeigten, war die Zelle in diesem sehr pathologisch anmutenden Zustand meistens noch nicht irreversibel geschädigt.)

Kurze Zeit vor dem Zelltod traten im Plasma viele kleine wäßrige Bläschen auf, die den Beginn der Trennung einer flüssigeren von einer festeren Phase anzeigten. Diese Phasentrennung, die unter fortwährenden ruckartigen Bewegungen des Plasmas vor sich ging, führte entweder zu zentral liegenden, großen und unregelmäßig gelappten Vakuolen, die bald spontan ihren flüssigen Inhalt nach außen abgaben, oder zu einer Ansammlung der flüssigen Phase unterhalb der Pellicula, so daß diese allmählich längsweits abgehoben wurde (Abb. 22 u. 23). Dieser Vorgang zeigt deutlich die stark eiweißfällende Eigenschaft von Chloronitrin.

In einer geringeren Chloronitrinkonzentration ($300 \gamma/\text{cm}^3$), in der die Paramecien ca. 40 Stunden lebten, traten die gleichen Abtötungssymptome in abgeschwächter Form auf:

Die Bewegung war langsam und ruckhaft infolge des stark reduzierten Wimperapparates. Die Cilien waren aber offenbar nicht einfach abgeworfen, sondern eingeschmolzen. Die abschmelzende Ciliensubstanz sam-

melte sich in den basalen Cilienbläschen an und machte diese stark lichtbrechend (Abb. 24).

Im Plasma befanden sich die stark lichtbrechenden Tropfen in großer Zahl.

Die pulsierenden Vakuolen waren zu mächtigen Flüssigkeitsblasen aufgetrieben und arbeiteten nicht.

Eine Bewegung des Plasmas war nicht festzustellen. Die Ausfällung der Plasmakolloide verursachte eine Trübung der Objekte; trotzdem konnte eine weniger starke Chromatinausfällung beobachtet werden.

Die Protozoen enthielten noch ihren gesamten Trichocystenbesatz; die Form der Trichocysten war unverändert. (Überhaupt hatten die Trichocysten unter dem Einfluß der Antibiotika nie ihre Form verändert.)

Xanthocillin (25 bis 50 γ /cm³)

Die Fluchtbewegungen waren nur mäßig. Auffälliger war eine schon früh einsetzende Volumzunahme und eine hiermit verbundene Erhöhung der Durchsichtigkeit der Zelle.

Zum Unterschied zu der Penicillinwirkung machte sich eine Lähmung der Vakuolenpulsation bereits zu Beginn der Volumzunahme bemerkbar.

Erst im Zustand der maximalen Schwellung begann sich das Plasma zu trüben und gleichzeitig hiermit nahm seine Beweglichkeit ab.

Kurz vor der Einstellung der Cilientätigkeit — die Paramaecien hatten keine Cilien abgeworfen und besaßen noch gleichmäßige Konturen — setzte die gleiche Phasentrennung ein, wie sie bereits beim Chloronitrin beschrieben wurde. Die Sonderung der festeren von der flüssigeren Phase erfolgte aber nicht so streng, wie es beim Chloronitrin der Fall war.

Die Abspaltung der Cilien erfolgte erst unmittelbar vor dem Zelltod.

Eine gesonderte Betrachtung verdienen noch die eigentümlichen Bewegungsformen, die die Paramaecien unter der Einwirkung von Xanthocillin ausführten.

In dem Stadium der beginnenden Volumzunahme schwammen die Paramaecien ruhig über eine kurze Strecke in einer steilen Linksschraube vorwärts, um dann plötzlich in einer flachen Linksschraube schnell rückwärts zu schwimmen, wobei die gleiche Weglänge zurückgelegt wurde wie bei der Vorwärtsbewegung; am Ende des Rückweges vollführten die Paramaecien einen Salto und wiederholten die eben beschriebene Bewegung in monotoner Folge. (Der Übergang von der normalen Linksschraube in die Rückwärts-Linksschraube soll bisher nur von Alverdes an konjugierenden Paramaecien gesehen worden sein. Kalmus, S. 82, 1931.)

Nach dem Abklingen dieser Bewegungsform folgte eine Taumelbewegung, die sich immer mehr verstärkte. Die Tiere sanken dabei auf den Grund und führten die Taumelbewegung eine Zeitlang monoton durch. Allmählich ging diese in eine langsame Rotation am Ort über.

Bei einigen Individuen konnten temporäre Taumelbewegungen schon früh, bei noch wenig verminderter Schwimgeschwindigkeit, auftreten. Sie

waren dann ein sicheres Kennzeichen einer besonders frühzeitigen Schädigung.

Xanthocillin verursachte in noch geringerer Konzentration (5 bis $10 \gamma/\text{cm}^3$) keine besonders auffällige Veränderung der Zellmorphologie. Wenn Veränderungen auftraten, dann waren diese schlecht reproduzierbar.

Trotzdem sei ein Ergebnis mitgeteilt, das aus dem Rahmen des bisherigen heraustritt. In zwei Versuchsserien ergab die Kontrolle eine sehr große Zahl verschieden großer und gegeneinander leicht beweglicher wäßriger Vakuolen, die höchstens die Größe von Nahrungsvakuolen erreichten. Die Vakuolen entstanden durch das Ineinanderplatzen winzig kleiner Bläschen, so daß in diesem Falle eine echte Plasmavakuolisierung vorlag.

Dadurch, daß die pulsierenden Vakuolen sehr rasch arbeiteten, kam es nicht zu einer Bildung besonders großer Vakuolen. Es konnte das Hineinplatzen der wäßrigen Bläschen in die pulsierende Vakuole und auch in deren Zuführungssystem beobachtet werden.

Ebenso auffällig war die hohe Strömungsgeschwindigkeit des Plasmas. Die leichte Verschiebbarkeit seiner Einschlüsse deutete auf eine erniedrigte Viskosität hin.

Obwohl reichlich Bakterien und Hefezellen vorhanden waren, besaß doch keines der Tiere gefüllte Nahrungsvakuolen. Dieser letzte Umstand legt allerdings nahe, daß die Nahrungsvakuolenbildung nicht nur von physikalischen Faktoren (Oberflächenspannung) bestimmt wird. Wäre dies der Fall, dann müßte eine geringe Viskosität des Plasmas den Vorgang der Nahrungsvakuolenbildung eher fördern als hemmen. Es scheint so zu sein, daß eine Herabsetzung der Oberflächenspannung erst dann eine Steigerung der Nahrungsvakuolenbildung hervorruft, wenn die Zelle eine Art Bereitschaft zur Bildung von Nahrungsvakuolen aufweist.

Dem nächsten Versuchsabschnitt liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

a) Sind die *Paramecien* imstande, ihre durch die Antibiotika erlittenen Schädigungen vollkommen zu beseitigen?

b) Wann erfolgt der Eintritt der irreversiblen Schädigung?

Ein einfaches Kriterium der normalen Zellfunktion ist die konstante Teilungsrate, die unter Aufrechterhaltung möglichst gleichmäßiger Ernährungs- und Temperaturbedingungen eine bestimmte Größe darstellt. Abweichungen von dieser Größe oder gar das Ausbleiben der Zellteilung lassen auf eine Stoffwechselschädigung schließen.

Versuchsführung:

Die *Paramecien* wurden in eine stärker letale Lösung des betreffenden Antibiotikums übergeimpft und der Zeitpunkt der Überimpfung notiert. In gleichmäßigen Zeitabständen wurden dann zwei (bei stärkerer Schädigung mehrere) *Paramecien*, nach vorheriger Passage durch reines Wasser, in das normale bakterienhaltige Medium zurückversetzt.

Nach dieser einfachen Methodik ergab sich für

Penicillin:

Die durch dieses Antibiotikum hervorgerufene Zellschädigung ist in hohem Maße reversibel. Selbst Paramaecien, die schon sehr stark eiförmig aufgetrieben waren und schwerfällig auf der Stelle rotierten, erlangten nach der Rückversetzung in das normale Medium innerhalb einer Stunde ihre normale Körperform wieder; 24 Stunden später wiesen sie die gleiche Teilungsrate auf wie die Kontrolltiere.

Erst wenn die Paramaecien bis zur Unförmigkeit aufgetrieben waren und fast regungslos auf dem Grunde lagen, kam es in dem normalen Medium zu einem Aufreißen der Pellicula.

Diese hohe Reversibilität der Penicillinschädigung steht in gutem Einklang mit der Ansicht, daß Penicillin nicht in das Zellinnere eintritt, sondern lediglich die Membrankolloide beeinflusst.

Streptomycin:

Paramaecien, die bis kurz vor der maximalen Schrumpfung in das normale Medium zurückversetzt wurden, wiesen nach höchstens einer Stunde das normale Volumen auf und bewegten sich lebhaft; nach ca. 48 Stunden war der Anschluß an die Teilungsrate der Kontrolltiere erreicht.

Maximal geschrumpfte Tiere brauchten bis zur Einstellung der ursprünglichen Körperform und Beweglichkeit schon eine etwa zweistündige Erholungszeit, und erst nach ca. 72 Stunden hatte die Teilungsrate den Kontrollwert erreicht.

Im Beginn der Schwellungsphase befindliche Zellen reagierten unterschiedlich: Bei dem größten Teil derselben setzte sich die pathologische Wasseraufnahme im normalen Medium weiter fort und bewirkte nach mehreren Stunden den Tod; die übrigen Zellen erholten sich allmählich und erreichten schließlich nach 96 bis 120 Stunden die gleiche Teilungsrate wie die Kontrolltiere.

Wurden die Paramaecien im weit fortgeschrittenen Schwellungsstadium umpipettiert, dann erfolgte regelmäßig der Zelltod.

Der sekundäre Wassereintritt in die Zellen kennzeichnet also den Beginn der irreversiblen Schädigung.

Bei der Feststellung der Regenerationsfähigkeit von Paramaecien, deren Teilung durch Streptomycin über mehrere Tage vollkommen gehemmt war (vgl. Tab. 3), ergab sich, daß ein großer Teil der Protozoen bereits irreversibel geschädigt war. Die Überlebenden erreichten nach ca. 48 Stunden die Teilungsnorm.

Chloronitrin:

Diejenigen Paramaecien, die bis zum Ablauf der ersten Hälfte der Abtötungszeit umpipettiert wurden, erreichten nach 48 Stunden die normale Teilungsrate. Nach dem Ablauf der halben Abtötungszeit setzte die irreversible Schädigung ein und erreichte etwa zu Beginn des letzten Viertels der Abtötungszeit ihre volle Stärke.

Paramaecien, deren Teilung durch Chloronitrin über mehrere Tage gehemmt war (vgl. Tab. 4), teilten sich nach der Versetzung in das normale Medium nach 24 bis 48 Stunden wieder normal.

Xanthocillin:

Hier überraschte der sehr schnelle Eintritt der irreversiblen Schädigung. Wurde eine Lösung verwandt, in der die Paramaecien 50 bis 60 Minuten lebten, dann genügte schon eine Behandlungsdauer von 3 bis 4 Minuten, um diese meistens irreversibel zu schädigen. Besonders empfindliche Individuen konnten noch früher irreversibel geschädigt werden.

Die reversibel geschädigten Zellen erholten sich jedoch bald vollständig.

Nach einer längeren, aber nicht so extremen Teilungshemmung (vgl. Tab. 5) teilten sich die Paramaecien nach der Überimpfung in xanthocillin-freies Medium nach 24 Stunden wieder normal.

Kombination der Antibiotika

Die Kombination der Antibiotika hat in der modernen Therapie große Bedeutung erlangt. In-vitro-Versuche und klinische Ergebnisse zeigten nämlich, daß eine Reihe pathogener Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika-Kombinationen viel weniger resistent sind als gegenüber dem einzelnen Antibiotikum (Bassalleck 1951; Ganster 1952 u. a.). Über das Zustandekommen dieser Wirkungssteigerung herrscht z. Z. aber noch eine ziemliche Unklarheit.

Die Lösung der Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Kombination setzt voraus, daß der Wirkungsmechanismus der Komponenten bekannt ist. Nach meinen bisherigen Beobachtungen erscheint mir die Wirkungsweise des Penicillins, wenigstens gegenüber den Protozoen, nicht so problematisch. Sein Einfluß erstreckt sich auf die Zellmembran; es erhöht deren Hydratationszustand und bewirkt eine gesteigerte Wasserpermeabilität; schließlich kommt es zu einer Membranerweichung.

Ich überlegte mir, daß auf Grund einer derartigen Membranveränderung die Durchlässigkeit der Zellmembran für zellfremde Substanzen ebenfalls gesteigert sein könnte. In der Tat ergab die Kombination der Antibiotika mit Penicillin auch dann eine deutliche Wirkungssteigerung, wenn die Penicillinkonzentration unterhalb der letalen Grenze lag.

Nachstehend wird im einzelnen über diese Ergebnisse berichtet.

1. Versuchsserie:

Penicillin + Streptomycin

Die Abtötungszeit betrug für Streptomycin, 10 mg/cm ³	= 222 Minuten
für Penicillin, 5000 IE/cm ³	= 19 Minuten
durch Kombination sank die Abtötungszeit auf	2 Minuten

Stufenweise Verringerung der Penicillinkonzentration bei gleichbleibender Streptomycinkonzentration ließ noch deutlicher den Anstieg der Streptomycinwirkung erkennen:

So betrug die Abtötungszeit für Penicillin, 3500 IE/cm ³	= 180 Minuten
durch Kombination sank die Abtötungszeit auf	16 Minuten

Die Paramaecien erfuhren bald nach ihrem Einbringen in die kombinierte Lösung eine so starke Schrumpfung, daß sie wie blattförmig erschienen. Kurz vor dem Zelltod erfolgte eine starke Volumzunahme.

Die Abtötungszeit betrug für Penicillin, 2500 IE/cm^3 = 225 Minuten
durch Kombination sank die Abtötungszeit auf 42 Minuten

Auffällig war auch hier die enorme Schrumpfung, nach der eine pathologische Volumzunahme einsetzte.

Erstaunlich war, daß selbst eine Penicillinkonzentration von 1000 IE/cm^3 , die unterhalb der letalen Grenze liegt, eine Senkung der Mortalitätszeit des Streptomycins von 222 Minuten auf 140 Minuten hervorrief. Die Schrumpfung verlief nicht so spontan, erreichte aber fast den gleichen Grad, wie vorstehend beschrieben.

2. Versuchsserie:

Penicillin + Chloronitrit

Die Abtötungszeit betrug für Chloronitrit, 1 mg/cm^3 = 75 Minuten
für Penicillin, 2000 IE/cm^3 = 330 Minuten
durch Kombination sank die Abtötungszeit auf 12 Minuten

Die Volumzunahme setzte schneller ein als in der reinen Chloronitritlösung; die Pellicula beulte an vielen Stellen aus und zerriß, so daß das Plasma an mehreren Stellen zugleich herausquoll. Der Vorgang erweckte den Eindruck der Cytolyse.

Auch in dieser Versuchsserie zeigte sich noch der Einfluß der nicht letalen Penicillinkonzentration von 1000 IE/cm^3 an der Herabsetzung der Abtötungszeit des Chloronitrits von 75 Minuten auf 32 Minuten. Die Volumzunahme verlief auch hier schneller als in der reinen Chloronitritlösung.

3. Versuchsserie:

Penicillin + Xanthocillin

Die Abtötungszeit betrug für Xanthocillin, $50 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$ = 280 Minuten
durch Kombination mit Penicillin, 2000 IE/cm^3 , sank die
Abtötungszeit auf 100 Minuten

Entgegen der durch Penicillin verursachten Wirkungssteigerung ergab die Kombination von Chloronitrit mit Streptomycin einen Wirkungsabfall.

Herkunft und Chemismus der stark lichtbrechenden Tropfen.

Wie auf Seite 20 und 23 berichtet wird, traten im Plasma der Paramaecien unter dem Einfluß von Streptomycin und besonders von Chloronitrit regelmäßig stark lichtbrechende und unterschiedlich große Tropfen auf.

Der Umstand, daß nur kurze Zeit nach dem massenweisen Eintreten der basalen Cilienbläschen in das Entoplasma viele dieser stark lichtbrechenden Tropfen auftraten (s. S. 23), ließ vermuten, daß diese aus Ciliensubstanz gebildet sein könnten.

In gutem Einklang mit dieser Vermutung stehen Beobachtungen über das Verhalten abgestoßener Cilien im Außenmedium.

In den Fig. 1—11 der Abb. 25 ist die Veränderung, die eine abgestoßene Cilie im Außenmedium durchmacht, in mehreren Phasen dargestellt.

Fig. 1 zeigt den Beginn einer Quellung und Membranabhebung am proximalen Cilienende. Danach kommt es, wie Fig. 2 zeigt, zum beiderseitigen Abfließen der Ciliensubstanz und zu ihrer polaren Anhäufung in einer sich immer mehr rundenden Blase (Fig. 2—4). Diese löst sich schließlich von dem schlanken Cilienteil, der einen mehr oder weniger großen stark lichtbrechenden Rest hinterläßt (vgl. Fig. 4 und 5).

Die sehr dehnbare Membran des Bläschens ermöglicht eine große Volumzunahme (Fig. 4 a).

Solche Stadien, wie sie in den Fig. 4, 5 und 4 a dargestellt sind, kamen auch im Entoplasma der Streptomycin- und Chloronitrintiere oft massen-

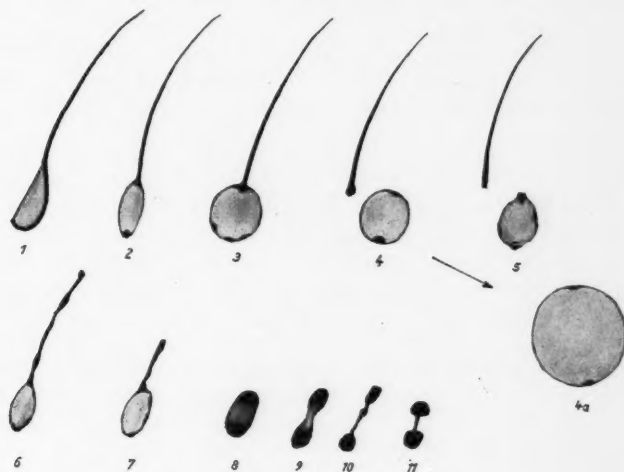


Abb. 25.

weise vor; es waren sicherlich die mehr oder minder stark gequollenen basalen Cilienbläschen. Der Einwand, daß es sich hierbei um stark gequollene Mitochondrien oder ähnliche Strukturen handeln könnte, wird damit entkräftet.

Daß die Ciliensubstanz auch vollständig zu kondensieren vermag, wurde ebenfalls an abgestoßenen Cilien festgestellt. Gelangte die abgestoßene, zunächst noch in der ganzen Länge schlanke Cilie in austretendes Hyaloplasma (Quetschpräparat), dann konnte beobachtet werden, wie die Ciliensubstanz allmählich vollständig in das schon früher gebildete basale Bläschen abfloß, so daß dieses stark lichtbrechend wurde (Fig. 6—8). Das nun von der Ciliensubstanz erfüllte Bläschen zeigte eine auffällige Tendenz zur hantelförmigen Durchschnürung (Fig. 9—11). Solche hantelförmige Teilungsfiguren konnten ebenfalls im Plasma antibiotikabehandelter *Paramecien* festgestellt werden.

Diese Befähigung zur Kondensation läßt es möglich erscheinen, daß die stark lichtbrechenden Tropfen durch eine Verschmelzung mehrerer basaler Cilienbläschen gebildet wurden. Ein solcher Vorgang konnte allerdings nicht direkt beobachtet werden.

Über die chemische Beschaffenheit der stark lichtbrechenden Tropfen ist nichts Sicheres anzugeben. Zwar fand v. Gelei nach Osmiumfixierung in den Cilien schwarz gefärbte kugelige und kurzstäbchenförmige Körnchen, die durch eine Behandlung mit Alkohol und Äther wieder zum Verschwinden gebracht werden konnten; aber hieraus auf den Lipoidcharakter der Körnchen zu schließen, erscheint mir verfrüht.

Auch die große Affinität der Tropfen zu basischen Farbstoffen, wie Akridinorange, Neutralrot, Bismarckbraun und Methylenblau, ist kein spezifischer Nachweis auf Lipide.

Leider war es mir nicht mehr möglich, ein von Spek (1942) beschriebenes Verfahren anzuwenden, nach dem es möglich sein soll, auf optischem Wege Lipide in lebenden Zellen nachzuweisen.

Diskussion

Beim **Penicillin** fehlt der cytostatische Wirkungsbereich fast vollständig. Der Grund hierzu ist folgender: Entweder werden die *Paramecien* in einer bestimmten Penicillinkonzentration eine so starke Volumzunahme erleiden, daß sie platzen, oder sie vertragen diese Konzentration eben noch und leben weiter. Wenn sich weiterhin zeigt, daß sich schon kurz vor dem Tod befindliche *Paramecien* im penicillinfreien Medium in erstaunlich kurzer Zeit erholen, dann ist anzunehmen, daß Penicillin in verhältnismäßig indifferenter Weise eine Steigerung der Wasserpermeabilität der Zellmembran bewirkt, und der Zelltod letzten Endes nur durch eine mechanische Zerstörung der Zellhaut infolge des hohen Binnendruckes eintritt.

Die „Schädlichkeit“ des Antibiotikums beruht offenbar darauf, daß es die Permeation schädigender Substanzen aus dem Außenmedium erhöht (vgl. die Kombinationsversuche).

Die an *Paramecium* und anderen Ciliaten gemachte Feststellung, daß Penicillin lediglich die Membran beeinflusst, wurde auch an Bakterien gemacht. Es zeigte sich, daß nur ein verschwindend kleiner Teil des Penicillins in das Cytoplasma der Bakterien eindringt; der übrige Teil haftet an der Zellwand. Durch eine Zertrümmerung und fraktionierte Abtrennung des Zellwandmaterials vom Plasma ergab sich, daß 72 bis 96% von der Zellwand aufgenommen wird. Mit welcher Zellwandkomponente Penicillin reagiert, können die Autoren nicht angeben. Es ist aber festgestellt worden, daß der aus Penicillin und Komponente gebildete Komplex leicht zerstört wird, wenn die Bakterien zertrümmert werden (A. v. Few, P. D. Cooper und D. Rowley 1952).

Problematischer sind die durch **Streptomycin** hervorgerufenen Zustandsänderungen. Als einziges Antibiotikum verursacht es eine Schrumpfung der Zelle. Daß diese durch eine Hypertonie des Mediums bedingt ist, ist nicht anzunehmen, denn bereits 5 mg/cm³ Hydrochloridsalz bewirken eine deut-

liche Schrumpfung. Dabei muß das hohe Molekulargewicht von Streptomycin noch berücksichtigt werden. Außerdem findet in bedeutend höheren Penicillinkonzentrationen keine Schrumpfung der Zelle statt, obwohl Penicillin ein viel geringeres Molekulargewicht besitzt.

Streptomycin beeinflusst während der Schrumpfungsphase nur die oberflächlichen Plasmakolloide, denn auch maximal geschrumpfte Zellen weisen nach der Rückversetzung in streptomycinfreies Medium nach einer Stunde die normale Körperform auf und schwimmen lebhaft. Für eine nur geringe Eindringtiefe des Antibiotikums sprechen auch die Beobachtungen, daß während der sekundär stattfindenden Volumzunahme weder die Geschwindigkeit der Plasmaströmung noch die Kerne verändert sind. Die Schrumpfung wird infolgedessen durch eine direkte Beeinflussung der Zellmembran hervorgerufen.

Worauf jedoch physikochemisch der starke Wasserentzug beruht, kann nicht sicher angegeben werden. Vielleicht liegt diesem Vorgang die gleiche Gesetzmäßigkeit zugrunde, die die sogenannte negative Osmose bewirkt.

Streptomycin verursacht ferner im streng cytotatischen Wirkungsbereich oftmals eine überdurchschnittliche Zunahme an Thymonukleinsäure und Gestaltveränderungen des Makronukleus. Die Folge ist eine Vergrößerung der Kernoberfläche. Es ist aber sicher nicht so, daß diese Oberflächenvergrößerung auf eine gesteigerte Arbeitsleistung der somatischen Komponente (Makronukleus) zurückgeführt werden kann, denn die Verarbeitung optimaler Nahrungsmengen ist ja nicht notwendig, da keine oder nur sehr wenige Nahrungsvakuolen vorhanden sind.

Im einfachsten Falle könnten die Formveränderungen der Kerne und ihr Zerfall in mehrere ungleiche Teilstücke durch den abnormen Gehalt an Thymonukleinsäure bedingt sein.

Der abnorme Gehalt an Thymonukleinsäure wird wahrscheinlich darauf beruhen, daß durch Streptomycin bedingte Funktionsstörungen die Substanzabgabe des Makronukleus an das Protoplasma hemmen, wodurch es zu einer Substanzanhäufung im Kern kommt; hier erfolgt dann der teilweise Um- und Aufbau der überschüssigen Substanzen zu DRS und RNS.

Es wäre noch darauf hinzuweisen, daß die Unregelmäßigkeit der Kernkonturen und der Kernzerfall Ähnlichkeit mit der sogenannten Kernfragmentation aufweist, die u. a. an degenerierenden Zellen beobachtet worden ist.

In welcher Weise Streptomycin in das Stoffwechselgeschehen eingreift, kann nach den vorliegenden Befunden nicht angegeben werden. Es scheint, als ob durch die starke Dehydratation der Zellmembran die Zellatmung herabgesetzt wird.

Chloronitrin hat ebenfalls nicht den Charakter einer ausgesprochen toxischen Substanz. Die frühzeitige völlige Lähmung der Tätigkeit der pulsierenden Vakuolen und die auffällige Verlangsamung der Schwimmbewegung sind die Folge eines starken Anstieges der Viskosität des Protoplasmas. Selbst wenn die Strömung des Protoplasmas infolge der gesteigerten Viskosität völlig zum Stillstand kommt und die Chromatin-

ausfällung fast vollständig ist, ist die Zelle nur reversibel geschädigt, denn sie kehrt nach der Rückversetzung in chloronitrirefreies Medium innerhalb kurzer Zeit in den Normalzustand zurück.

Auch die cytostatische Wirksamkeit von Chloronitrit beruht offenbar auf der Lähmung der Zelltätigkeiten infolge der gesteigerten Viskosität des Protoplasmas.

Xanthocillin X ist eine ausgesprochen toxische Substanz. Die Toxizität kommt besonders deutlich durch die sehr frühzeitige irreversible Schädigung der Zelle zum Ausdruck. Die Feststellung daß schon äußerst geringe Konzentrationen des Antibiotikums die Tätigkeit der pulsierenden Vakuolen und die Schwimmbewegung hemmen, ohne daß cytomorphologische Veränderungen auftreten, deuten auf eine frühzeitige Schädigung besonders lebenswichtiger Zentren.

Die nach dem Zeitpunkt der irreversiblen Schädigung stattfindende starke Volumzunahme und schließlich die Ausfällung der Plasmakolloide und Nukleoproteide sind dann nicht mehr der Ausdruck einer spezifischen Wirkung des Antibiotikums.

Nach dem Zeitpunkt des Eintrittes der irreversiblen Schädigung hatte sich die folgende Toxizitätsreihe ergeben:

Am geringsten toxisch ist Penicillin, dann folgt Streptomycin — Chloronitrit — Xanthocillin. Es ist bemerkenswert, daß diese an *Paramecium caudatum* gefundene Toxizitätsreihe mit der an der Maus gefundenen übereinstimmt (s. Beiersdorf und Ahrens, Tab. IV).

Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung von Penicillin, Streptomycin, Chloronitrit und Xanthocillin X an *Paramecium caudatum* geprüft.

Ca-Penicillin (Wertigkeit: 1100 IE/mg):

4200 IE/cm³ (= 3,8 mg/cm³) bewirken nach ca. 175 Minuten den Tod der Paramecien. Oberhalb dieser Konzentration verkürzt sich die Abtötungszeit proportional mit dem Konzentrationsanstieg; es ergibt sich eine typische Absterbekurve.

Die Konzentration von 4200 IE/cm³ stellt einen Grenzwert dar, denn eine verhältnismäßig geringe Senkung dieses Wertes um 800 IE/cm³ läßt die Abtötungszeit auf über 48 Stunden ansteigen.

Unterhalb 4200 IE/cm³, bis etwa 2000 IE/cm³, zeichnet sich also ein weniger stark letales Konzentrationsgebiet ab.

In einem Bereich von 1250 bis 400 IE/cm³ wird die Zellteilung deutlich gefördert.

Zwischen dem weniger stark letalen Gebiet und dem Gebiet der Teilungsförderung liegt eine nur enge Konzentrationsspanne, in der es zu einer mehrtägigen Teilungshemmung kommen kann. In der Regel tritt jedoch eine vollständige Teilungshemmung, die mehrere Tage andauert, nicht auf. Penicillin fehlt somit der cytostatische Wirkungsbereich.

Unter 400 IE/cm³ ist keinerlei Wirkung zu verzeichnen.

Die Wirkung von Penicillin hängt stark vom pH des Mediums ab. Seine maximale Wirkung entfaltet es im sauren Bereich (pH 4,5–6,8).

Penicillin besitzt nur eine geringe Toxizität. Sein Einfluß erstreckt sich auf die Zellmembran, indem es deren Wasserpermeabilität und Plastizität erhöht. Im stärker letalen Bereich kommt dies durch eine pathologische Volumzunahme und eine sich hieran anschließende Verformung der Zelle zum Ausdruck. Diese zeichnet sich bis zum Tode durch eine gesteigerte Durchsichtigkeit aus. Morphologische Veränderungen der Plasmastrukturen treten nicht auf.

Die geringe Toxizität zeigt sich besonders an dem sehr späten Eintritt der irreversiblen Schädigung. Selbst *Paramecien*, die bereits stark eiförmig aufgetrieben sind und langsam auf der Stelle rotieren, erlangen nach der Versetzung in penicillinfreies Medium schon nach einer Stunde ihre ursprüngliche Form und Bewegung zurück; ihre Teilungsfähigkeit ist danach ebenfalls normal.

Die Penicillinwirkung erfolgt sicher unabhängig von bestimmten Kernteilungsphasen; denn mehrere Stunden alte Zellen, unmittelbar vor der Teilung befindliche Zellen, Teilungsstadien, ganz junge Tochterzellen und auch Konjuganten weisen die gleiche Penicillinresistenz auf.

Ca-Streptomycin (Wertigkeit: 507 SE/cm³):

Es sind schon 10 mg/cm³ notwendig, um *Paramecium* nach 150 bis 200 Minuten abzutöten. Bei einem weiteren Anstieg der Konzentration ergibt sich eine im Prinzip gleiche Absterbekurve, wie sie auch beim Penicillin auftritt.

Ähnlich wie beim Penicillin ist der stärker letale Bereich dadurch abgegrenzt, daß eine verhältnismäßig geringfügige Senkung der Konzentration eine bedeutende Verlängerung der Abtötungszeit hervorruft.

Ein wesentlicher Unterschied zur Penicillinwirkung besteht darin, daß Streptomycin unterhalb des schwächer letalen Bereiches die Zellteilung vollständig hemmt; der Bereich der Teilungshemmung umfaßt 2 bis 0,8 mg/cm³.

Unter diesem cyto statischen Bereich liegt schließlich ein Konzentrationsgebiet, in dem die Teilung der *Paramecien* deutlich gefördert ist; es umfaßt etwa 0,4 bis 0,1 mg/cm³.

Eine pH-Abhängigkeit der Wirkung ist wenig ausgeprägt

Im Gegensatz zu Penicillin verursacht Streptomycin in stärker letaler Konzentration eine weitgehende Schrumpfung der Zelle; dieser Schrumpfung, die wenigstens die erste Hälfte der Abtötungszeit einnimmt, folgt eine starke Volumzunahme.

Paramecium bleibt trotz der Volumzunahme undurchsichtig; seine Oberflächenskulptur springt scharf hervor. Hieraus kann auf eine Dehydratation der Zellmembran geschlossen werden.

Ergänzende Versuche mit dem Streptomycin-Hydrochloridsalz, das die Durchsichtigkeit des Objektes nicht ganz so stark verminderte, ergaben weder eine Veränderung des Makronukleus noch eine deutliche Änderung der Viskosität des Protoplasmas.

Erst nach dem Aufhören der Cilientätigkeit (Zelltod) dringt das Antibiotikum in das Zellinnere und verursacht eine Ausfällung der Plasmakolloide.

Die Wirkung des Streptomycins ist gegenüber Paramaecien, die sich in verschiedenen Phasen der Kern- und Zellteilung befinden, unverändert. Auch gegenüber Konjuganten ist die Wirkung unverändert.

Streptomycin ist etwas stärker toxisch als Penicillin. Maximal geschrumpfte Paramaecien erhalten nach etwa zweistündigem Verbleib in der streptomycinfreien Lösung ihre ursprüngliche Form zurück und schwimmen lebhaft; die normale Teilungsrate stellt sich nach 48 Stunden ein. Dagegen sind Paramaecien, an denen der Beginn der sekundären Volumzunahme wahrzunehmen ist, oftmals schon irreversibel geschädigt.

Werden Paramaecien nach einer 96- bis 120stündigen Teilungshemmung in streptomycinfreies Medium umpipettiert, dann ergibt sich bei den meisten eine irreversible Schädigung; die noch nicht irreversibel geschädigten Individuen erholen sich jedoch verhältnismäßig schnell.

Nach einer 72stündigen Teilungshemmung zeigen die Paramaecien eine erhebliche Größenabnahme und ein Schütterwerden der Bewimperung. Ihr Makronukleus ist mehr oder weniger verändert, er ist langgestreckt, unregelmäßig gelappt oder in zwei bis mehrere Teilstücke zerfallen. Diese Formveränderung ist oft von einer Zunahme an Thymonukleinsäure begleitet.

Der Mikronukleus erscheint unverändert. Es ist bemerkenswert, daß an Paramaecien, die infolge irgendeines Umstandes keinen Mikronukleus besitzen, eine besonders extreme Gestaltveränderung und Größenzunahme des Makronukleus auftritt.

Die Zellmembran ist dehydratisiert und verleiht den Tieren ein starres Aussehen.

Chloronitrin:

5 mg/cm³ töten die Paramaecien bereits nach 2,5 Minuten, und in einer Konzentration von 3 mg/cm³ leben sie etwa 150 Minuten. Mit der weiteren Verringerung der Konzentration nimmt die Abtötungszeit proportional bis etwa 200 μ /cm³ zu.

Bei dieser Konzentration setzt eine starke Teilungshemmung ein, die unter 40 μ /cm³ allmählich schwächer wird.

Die Wirkung von Chloronitrin ist pH-abhängig, sie erhöht sich beiderseits des neutralen Bereiches (pH 6,46–7,16) mit der Zunahme der Azidität bzw. Alkalität.

Zum Unterschied zu Penicillin und Streptomycin dringt Chloronitrin schnell in das Zellinnere, verursacht durch eine allmähliche Viskositäts-erhöhung die vollständige Hemmung der Plasmaströmung und schließlich die Ausfällung der Plasmakolloide sowie der Nukleoproteide im Makro- und Mikronukleus (Verklumpung der Chromosomen).

Diese Zustandsänderungen sind noch reversibel, wenn die Zelle bis zum Ablauf der halben Abtötungszeit in chloronitrinfreies Medium übergeimpft wird. Die normale Teilungsrate stellt sich nach höchstens 48 Stunden ein. Mit dem Beginn der zweiten Hälfte der Abtötungszeit setzt die irreversible Schädigung ein.

Nach einer 96stündigen Teilungshemmung sind die Zellen noch nicht irreversibel geschädigt; nach 24 bis 48 Stunden ist die Teilung wieder normal.

Auch beim Chloronitrin ergeben sich für *Paramecien*, die sich in verschiedenen Phasen der Kern- und Zellteilung befinden, sowie für Konjuganten unveränderte Mortalitätswerte.

Xanthocillin: 100 bis 50 γ/cm^3 bringen die *Paramecien* nach etwa 35 Minuten zum Absterben. Doch selbst 5 γ/cm^3 sind noch tödlich; der Zelltod erfolgt nach 22 bis 24 Stunden.

Der unter der Letalgrenze befindliche cytostatische Wirkungsbereich ist nicht immer gleich stark ausgeprägt. Gerade in den sehr niedrigen Konzentrationen macht sich eine große Streuung der Werte bemerkbar, die den Gang der Untersuchung erschwert.

Neben der hohen Wirkungsstärke überrascht der schnelle Eintritt der irreversiblen Schädigung. Bei einer Mortalitätszeit von 60 Minuten genügen 3 bis 4 Minuten, um die Zelle irreversibel zu schädigen. Die nicht irreversibel geschädigten Zellen erholen sich innerhalb kurzer Zeit.

Nach einer 96stündigen Teilungshemmung teilen sich die *Paramecien* im xanthocillinfreien Medium nach 24 Stunden wieder normal.

Die Wirkung ist stark vom pH abhängig. Das Wirkungsmaximum liegt auf der alkalischen Seite (pH 7,55–9,18).

Wird Penicillin mit Streptomycin, Chloronitrin und Xanthocillin kombiniert, dann erhöht sich die Wirkung der Komponente. Der Wirkungsanstieg ist bei der Kombination Penicillin-Streptomycin und Penicillin-Chloronitrin selbst dann noch eindeutig, wenn die Penicillinkonzentration nur 1000 IE/ cm^3 beträgt, ein Wert, der unter der Letalgrenze liegt.

Der Wirkungsanstieg beruht offenbar auf einer Permeabilitätserrhöhung der Zellmembran durch Penicillin.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Rostock ausgeführt. Herr Prof. Dr. Dr. K. P o p p e, Direktor des Instituts, stellte mir in freundlicher Weise einen Arbeitsplatz, die notwendigen Apparaturen und Materialien zur Verfügung. Herrn Prof. Dr. Dr. Poppe möchte ich hiermit meinen besten Dank aussprechen.

Herr Prof. Dr. J. S p e k, Direktor des Zoologischen Instituts der Universität Rostock, orientierte sich laufend über den Stand meiner Untersuchungen und gab mir Hinweise. Herrn Prof. Dr. Spek danke ich vielmals für seine Bemühungen.

Literatur

- Augustine u. Mitarb., 1949: Zit. in W. E. Herrel und E. Schulze: Penicillin und andere Antibiotika. Stuttgart, Hirzel.
Bassallek, H., 1951: Dtsch. med. Wschr. 44, 1373.
Beiersdorf, R., und W. Ahrens, 1953: Die Pharmazie 8, H. 10.
Colle, B. A., 1947: J. Parasitol. 33, 405.
Doflein, F., und E. Reichenow, 1949: Lehrbuch der Protozoenkunde, 1. Teil, 6. Aufl. Jena, Fischer.

- Few, A. v., P. D. Cooper, and D. Rowley, 1952: *Nature* 169, 285.
 Ganster, J., 1952: *Dtsch. Ges.wesen* 7, H. 37, 1170.
 Herrel, W. E., u. Mitarb., 1949: Zit. in W. E. Herrel und E. Schulze: *Penicillin und andere Antibiotika*. Stuttgart, Hirzel.
 Holt, C. v., 1952: *Dtsch. med. Wschr.* 77, 341.
 Jirovec, O., 1951: *Schweiz. Z. allg. Pathol.* 14, 653.
 — 1951: Ref. in *Apoth. Z. Bln.* 3, 116.
 — 1953: Ref. in *Ber. ges. Physiol.* 59, H. 3.
 — 1949: *Experientia* Vol. 5, Fasc. 2, 74.
 Kalmus, H., 1951: *Paramecium*. Jena, Fischer.
 Klosa, J., 1952: *Antibiotika*. Berlin, Technik.
 Loeffler, J. B., 1950: *Proc. Amer. Soc. Protozoologist* 1.
 — 1949: *Texas Sci. Journ.* 1, 92.
 Lützenkirchen, A., 1952: *Z. Haut- und Geschlechtskrankh.* 13, 307.
 Lyons, Champ, 1949: Zit. in W. E. Herrel und E. Schulze, 1949: *Penicillin und andere Antibiotika*. Stuttgart, Hirzel.
 Merck's, E., 1947—1948: *Jahresbericht* 61 und 62, 237.
 Molaret, 1947—1948: Zit. in Merck's *Jahresbericht* 61 und 62, 283.
 Morgan, B. B., and H. M. Campbell, 1946: *Amer. J. Vet. res.* 7, 45.
 Musznug, G., 1949: *Pharmazie* 4, 207.
 Robinson, H. J., 1949: Zit. in W. E. Herrel und E. Schulze: *Penicillin und andere Antibiotika*. Stuttgart, Hirzel.
 Spek, J., 1942: *Protoplasma* 37, H. 1, 49.
 — 1924: *Z. Zellenlehre* 1, 278.
 Spingarn und Edelmann, 1949: Zit. in Merck's *Jahresbericht*, 63, 364.
 Smith, R., u. Mitarb., 1948: *Bakteriology* 55, 425.
 Vogel, H., 1951: *Die Antibiotika*. Nürnberg, Carl.
 Walter u. Mitarb., 1951: Zit. in Merck's *Jahresbericht* 65, 403.

Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen¹

(Modellversuche über die Beeinflussung der Plasmastruktur von Pflanzenzellen durch Düngemittel)

Von

Susanne Markert

Aus dem Institut für landwirtschaftliches Versuchs- und Untersuchungswesen
Leipzig der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.

Direktor: Dr. H. Peter

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. September 1954)

Ein wichtiges Ergebnis der modernen Zellphysiologie ist der Befund, daß protoplasmatische Strukturen Richtung und Intensität physiologischer Prozesse wesentlich beeinflussen können und daß auch umgekehrt die physiologischen Prozesse einen Einfluß auf den kolloiden Strukturzustand des Plasmas ausüben. Es liegt also eine wechselseitige Beeinflussung vor.

Aus dieser Korrelation kann man schließen, daß die in vivo beobachteten Erscheinungen, wie z. B. Fermentaktivität, Alterungsgeschwindigkeit, Dürre- und Frostresistenz, Transpirationsintensität, Stoffaufnahme usw., ein Ausdruck physikalisch-chemischer Grundvorgänge sind, die sich in bzw. an den Plasmakolloiden abspielen. Anders ausgedrückt: Für die Regulation physiologischer Prozesse ist der kolloide Zustand des Plasmas hinsichtlich des Dispersitätsgrades, Aktivität der Wasserbindung und des elektrokinetischen Potentials (sowie der von diesen Faktoren abhängigen Größen, wie Viskosität, Permeabilität, Synärese u. a.) von ausschlaggebender Bedeutung.

Der Kolloidzustand des Plasmas seinerseits ist nun nicht stationär, sondern ist, wie oben bereits erwähnt, vom Ablauf der physiologischen Prozesse beeinflussbar. Außerdem wird der kolloide Zustand des Plasmas auch von dem Milieu beeinflusst, in welchem das betreffende Individuum

¹ Aus einer der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Leipzig 1955 vorgelegten Dissertation, die in der DDR nur in wenigen Schreibmaschinen-Exemplaren versandt wurde.

lebt. Besonders Temperatur und Wassersättigung der Umgebung, sowie das Ionenmilieu (z. B. Salzgehalt des Bodens oder der Nährflüssigkeit) üben einen Einfluß aus, indem sie Viskosität, Permeabilität, Synäresgeschwindigkeit der Plasmakolloide verändern können. Es ist also der Grad der physiologischen Aktivität der Gewebe auch vom Milieueinfluß abhängig.

Die Temperatur und der Wassersättigungsgrad der Umgebung einer größeren Anbaufläche von Kulturpflanzen sind im allgemeinen nur schwierig so zu halten, daß sie dauernd dem Optimum der Lebensbedingungen der betreffenden Pflanzen entsprechen. Die genannten Faktoren, die einen wesentlichen Einfluß auf die Struktureigenschaften der Zellkolloide ausüben, scheiden also auf Grund der eben angeführten Unbeeinflussbarkeit durch den Ackerbauer für die Praxis zunächst aus. Veränderungen der Zellkolloide können jedoch auch durch Salze bzw. deren Ionen hervorgerufen werden, wie bereits erwähnt wurde. Diese Tatsache ist deshalb von praktischem Belang, weil die Mineraldüngemittel als derartige Ionen auf das Zellplasma einwirken und es in seiner kolloiden Struktur verändern. Düngemaßnahmen können daher je nach Menge und Verhältnis der Bestandteile der beigefügten Salze die physiologische Aktivität der Pflanze fördern oder bei unzumutbarer Zusammensetzung schädigend wirken. Es müßte demnach möglich sein, durch geeignete Düngemaßnahmen, die in der Hand des Ackerbauers liegen, den Kolloidzustand des Plasmas so zu beeinflussen, daß die biologische Aktivität der Gewebe und damit auch Ertragshöhe und Ertragssicherheit eine Steigerung erfahren.

Zur Erreichung dieses Zieles ist jedoch eine genaue Kenntnis der Wirkung der betreffenden Mineralsalze auf das Zellplasma erforderlich. Es ist also eine Erforschung derjenigen physikalisch-chemischen Grundvorgänge an den Zellkolloiden nützlich, die auftreten, wenn Elektrolyte auf Plasmakolloide einwirken.

Zur Ermittlung dieser physiko-chemischen Grundlagen erscheinen Untersuchungen an kolloiden Systemen *in vitro* mit bestimmten Modellsubstanzen zweckmäßig. Modellversuche haben schon oft in solchen Fällen zur Lösung eines Problems beigetragen, in denen eine Untersuchung am lebenden Objekt wegen der Fülle von verschiedenartigen, oft undefinierbaren Nebenfaktoren scheinbar widersprechende Befunde ergab. Die Betrachtung der Zelle als ein kolloides System ist durchaus nicht abwegig und hat schon in mancher Hinsicht eine Vertiefung des Einblickes in die Natur physiologischer Vorgänge ermöglicht.

Es wurden deshalb derartige physikalisch-chemische Untersuchungen durchgeführt, um die Wirkung verschiedener Elektrolytzusätze zu untersuchen. Die Blickrichtung wandte sich dabei insbesondere auf die Beeinflussung des Wasserhaltevermögens pflanzlicher Zellinhalte. Die Untersuchungen erstreckten sich im wesentlichen auf Elektrolyte, die Verwendung als Mineraldünger finden. Im Vordergrund des Interesses stand der Einfluß der Kalium- und Calciumionen auf den Kolloidzustand sowie die Wirkung des pH-Faktors. Als Modellsubstanz fand Agar Verwendung, das der sonst üblichen Gelatine vorgezogen wurde, da es pflanzlicher Her-

kunft ist und wegen seines Gehaltes an polymeren Kohlehydraten der Zusammensetzung pflanzlicher Zellinhalte nahekommmt.

Es wurden bei der Bearbeitung des vorliegenden Themas viskosimetrische Messungen durchgeführt, über deren Ergebnisse nachfolgend in gedrängter Kürze das Wesentliche berichtet werden soll.

Die Kenntnis der Viskosität und der Einfluß von Elektrolyten auf diese erschien deshalb als besonders wichtig, weil eine erhöhte Plasma-viskosität als eines der typischsten zellphysiologischen Kennzeichen für eine erhöhte Resistenz gegen Dürre und Kälte gilt. Der Befund, daß dürreresistente Pflanzen ein viskoseres Plasma besitzen als dürrereempfindliche, wurde in den letzten Jahren von einer Reihe von Autoren an Hand von Zentrifugierungsversuchen sowie durch Anwendung der Weberschen Plasmolysezeit-Methodik gewonnen und übereinstimmend angegeben: P. A. Henkel [5], H. Schmidt, K. Diewald und O. Stocker [12], D. Seible [13], H. Schmidt [11], S. Strugger [16], O. Stocker [15], R. Newton und W. M. Martin [8], A. Pisek [9].

Es ist aus den Erfahrungen der Kolloidchemie bekannt, daß die Viskosität biogener, hydrophiler Kolloide einem starken Einfluß durch Elektrolyte unterliegt. Entsprechend dem allgemeinen Verhalten hydrophiler Kolloide wird die Ursache für eine Veränderung der Plasmastruktur in der Richtung der Viskositätssteigerung in der Erhöhung der Hydrophilie, d. h. der Wasserbindefähigkeit des Plasmas, und in einer Verminderung des Gehaltes an freiem, intermizellarem Wasser des Plasmas gesucht: W. Ruhland und W. Kessler [10], H. W. Fuchs [4], J. Weigert und H. Weizel [18].

Durch Vergrößerung der wasserhaltenden Kraft wird die Stabilität gegen wasserentziehende Einflüsse (durch Frost und Dürre) erhöht.

Die physikalische Voraussetzung der viskosimetrischen Messungen war, daß die Beziehung Einsteins [3] es gestattet, Aussagen über das Verhältnis des Kolloidvolumens zum Gesamtvolumen zu machen. Sie lautet:

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5 \varphi) \quad (1)$$

dabei bedeuten: η_0 die innere Reibung des Wassers und φ das Gesamtvolumen der dispersen Phase in der Volumeneinheit des Dispersionsmittels. Für Teilchen einer willkürlichen Gestalt hat v. Smoluchowski [14] die Einsteinsche Formel erweitert zu:

$$\eta = \eta_0 (1 + K \varphi) \quad (2)$$

Durch die Einführung des Faktors K behält die Einsteinsche Gleichung auch für Biokolloide, deren Teilchen keine Kugelform besitzen, Gültigkeit.

Die Größe φ , die Ausdruck des Gesamtvolumens ist, kann aus drei einzelnen Volumina bestehend aufgefaßt werden:

1. das Volumen der wasserfreien, dispergierten Substanz selbst,
2. das Volumen des Hydratwassers,
3. das Volumen des stagnierenden, in intermizellaren Höhlungen eingeschlossenen kapillaren Wassers.

Veränderungen des Volumens 1 können sich durch Änderung der Teilchenstruktur (Änderung des Dissymmetriefaktors) ergeben. Faktoren, die geeignet sind, das Ausmaß der elektrischen Ladungen der Kolloids substanz zu verändern, werden mit Wahrscheinlichkeit das unter 2 angeführte Volumen beeinflussen, da sie auf diesem Wege einen Einfluß auf die Hydratation der Kolloidionen ausüben. Zum anderen werden sich Änderungen in der nichtionischen Hydratation, in der Kettenlänge und in der kolloiden Struktur durch eine Veränderung des Volumens 3 auswirken. Im wesentlichen werden Veränderungen in der Größe des Hydratmantels (Schwammwasser) um das Kolloidteilchen für Viskositätsänderungen verantwortlich zu machen sein, da bei gleichbleibender Untersuchungssubstanz die Teilchen stets die gleiche Form haben.

Bei der Meßtechnik war es erforderlich, Fehler, die durch turbulentes Strömen, Strukturviskosität, Alterung, thermische Einflüsse, Lagerung des Viskosimeters, Methodik der Herstellung der Agar-Elektrolytmischungen usw. hervorgerufen werden können, zu vermeiden. Es war daher notwendig, eine besondere Arbeitsmethodik auszuarbeiten. Diese ist in allen Einzelheiten in der Originalarbeit (Diss. Markert, S. 11—28 [7]) angegeben. Zur Durchführung der Messungen wurde ein Viskosimeter nach Tsuda [17] benutzt.

Bei der vergleichenden Viskositätsmessung ergab sich im wesentlichen folgendes:

Ein Zusatz einzelner, isolierter Elektrolyte (KCl, NaCl, KNO₃, K₂SO₄; CaCl₂, BaCl₂, MgCl₂, FeCl₃, AlCl₃; KOH, NaOH; HCl, HClO₄, H₂SO₄) in äquivalenten Mengen bewirkte in allen untersuchten Fällen, daß eine mehr oder weniger starke Viskositäts erniedrigung eintrat. Für diese Viskositätsdepression ist das Kation verantwortlich zu machen, während das Anion nur eine untergeordnete Rolle spielt. Bei gleichen Äquivalentkonzentrationen der verschiedenen Elektrolyte sind die relativen Viskositätsabnahmen nicht gleich, sondern nehmen in der Reihenfolge KCl < CaCl₂ < FeCl₃ zu, wie aus Abb. 1 ersichtlich ist. So beträgt z. B. bei einer Elektrolytkonzentration von 10,0 Millival die beobachtete Viskosität in Prozenten der Anfangviskosität (Wasserzusatz) bei KCl = 79%, CaCl₂ = 75%, FeCl₃ = 64%. Der Einfluß der Valenz des Kations tritt also stark in den Vordergrund.

In Abb. 1 sind als Repräsentanten für ein-, zwei- und dreiwertige Kationen die Kurven für KCl, CaCl₂ und FeCl₃ dargestellt, während HCl und KOH die Kurvenbündel für Säuren bzw. Laugen vertreten. Auf der Ordinate ist die relative Viskosität η_{rel} aufgetragen, die Abszisse gibt die Äquivalentkonzentration der Lösungen im negativen logarithmischen Maßstab wieder. (η_{rel} entspricht der gemessenen Durchlaufzeit im Verhältnis zu der des Wassers: $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$).

Diese ermittelte Viskositäts erniedrigung ist bei allen negativ geladenen Biokolloiden nach Zusatz eines Elektrolyten anzutreffen, wie die Erfahrungen der Kolloidchemie zeigen.

Mit den Erkenntnissen der Pflanzenphysiologie steht dieses Verhalten insofern im Einklang, als auch hier einzelne, isolierte Salze ausgesprochen giftig für den Organismus sind. Dies geht namentlich aus den bekannten Untersuchungen von Lillie, Ringer, J. Loeb, Herbst, Wo. Ostwald, Osterhout, Fitting u. a. hervor. Die genannten Autoren fanden, daß reine Salzlösungen stets abnorme Zustände des Protoplasmas hervorrufen, dagegen Salzgemische, in denen die Nährelemente in genau ausbalancierten Verhältnissen stehen, auf das Protoplasma eine günstige Wirkung ausüben. R. Höber [6] bezeichnet das Verfahren, die Bedeutung der Salze für die Lebensvorgänge durch Versuche mit den Lösungen einzelner Salze erkennen zu wollen, als unphysiologisch. Wo immer die Zellen von einem salzhaltigen Milieu gebadet werden, da handelt es sich um eine Salzmischung. Außer im ausgeruhten Naturboden befinden sich physiologische Elektrolytkombinationen in den Nährlösungen (A-Z-Lösung Hoaglands u. a., Ringerlösung), in der Blutflüssigkeit, aber vor allem im Zellsaft und im Plasma selbst. Diese verschiedene und sogar entgegengesetzte physiologische Wirkung einzelner Ionen wird als *Ionenantagonismus* bezeichnet.

Wenn Elektrolytzusätze nach den bisherigen Erfahrungen der vorgenommenen Messungen in jedem Falle eine mehr oder weniger starke Viskositätsherabsetzung hervorriefen, so hätte daraus geschlossen werden können, daß eine Mineralsalzdüngung auch in jedem Falle die Viskosität des Pflanzenplasmas vermindert. Das würde jedoch im Gegensatz zu den Befunden vorgenannter Autoren stehen, die angeben, daß die erhöhte wasserhaltende Kraft bei dürreresistenten Pflanzen ihren Ausdruck in einer Viskositäts^{erhöhung} der Plasmakolloide findet. Das Ziel der Untersuchungen war es, den Ursachen nachzugehen, die bewirken, daß eine geeignete Düngung den Wasserhaushalt der Pflanze günstig beeinflussen kann, wie dies besonders von A. Arland und Mitarbeitern [1, 2] gefunden worden ist.

Es ergab sich aus den bisher dargestellten Ergebnissen die Aufgabe, daß

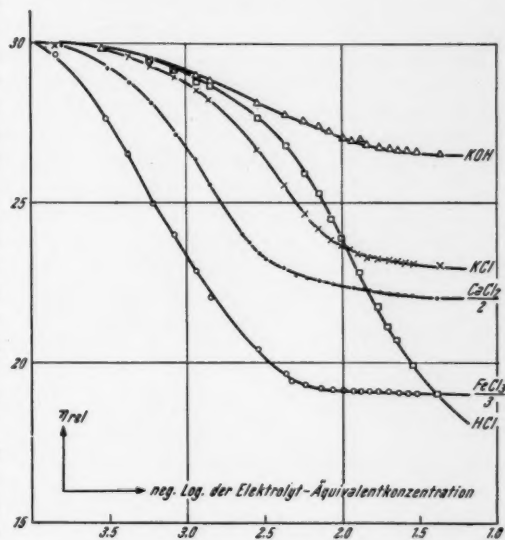


Abb. 1. Viskositätserniedrigung nach Zusatz einzelner Elektrolyte zu Agarsol.

ein Weg gefunden werden mußte, der es gestattet, diese zwei sich scheinbar widersprechenden Gegebenheiten zu verbinden. Die Fragestellung war also die folgende: Wie kann bei Elektrolytzufuhr, die bei der Pflanze durch Aufnahme von Mineraldüngemitteln erfolgt, eine Viskositätssteigerung stattfinden?

Die Möglichkeit, zu einem positiven Ergebnis zu gelangen, wurde darin gesucht, Kolloidanaloga für die in der Physiologie so wichtigen antagonistischen Wirkungen der Ionen aufzuzeigen. Da besonders die Alkali- und Erdalkali-Ionen, welche bei vielen physiologischen Antagonismen eine Rolle spielen, über die Zellkolloide hinweg ihre Wirkung ausüben, war es naheliegend, daß sich dieser Antagonismus auch modellmäßig wiedergeben läßt.²

Es wurden daher Untersuchungsreihen angeschlossen, die zum Ziele hatten, die Wirkung verschiedener Mischungsverhältnisse von KCl und CaCl_2 auf die Viskosität von Agar zu untersuchen.

Über die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe wird nachstehend berichtet. Es wurden die folgenden Serien mit je einem bestimmten Mischungsverhältnis untersucht:

Ca : K	in %
1 : 1 =	50 : 50 %
1 : 2 =	33,33 : 66,67 %
1 : 3 =	25 : 75 %
1 : 4 =	20 : 80 %
1 : 5 =	16,67 : 83,33 %
1 : 6 =	14,29 : 85,71 %
1 : 10 =	9,09 : 90,91 %
1 : 15 =	6,25 : 93,75 %
1 : 20 =	4,76 : 95,24 %
1 : 30 =	3,23 : 96,77 %
1 : 50 =	1,96 : 98,04 %
1 : 80 =	1,23 : 98,77 %
1 : 100 =	0,99 : 99,01 %
2 : 1 =	66,67 : 33,33 %
3 : 1 =	75 : 25 %
4 : 1 =	80 : 20 %
5 : 1 =	83,33 : 16,67 %
6 : 1 =	85,71 : 14,29 %
10 : 1 =	90,91 : 9,09 %
15 : 1 =	93,75 : 6,25 %
20 : 1 =	95,24 : 4,76 %
50 : 1 =	98,04 : 1,96 %
80 : 1 =	98,77 : 1,23 %

Die angegebenen Mischungsverhältnisse beziehen sich auf Äquivalentkonzentrationen. Der pH-Wert betrug 5,5 bei allen Serien.

² Bereits J. L o e b (J. biol. Chem. (Am.) 1918, 31, 343; 34, 77 u. 489; 35, 497) ging diesen Weg, indem er Beispiele solcher Kolloidmodelle bei seinen Versuchen mit Gelatine gab. Der bei Zusatz von Mischlösungen von Alkali- und Erdalkalitionen auftretende Quellungszustand entsprach allerdings nur dem additiven Verhalten der zugesetzten Ionen.

Bei der Untersuchung der Wirkung dieser verschiedenen Mischungsverhältnisse von Ca : K ergab sich, daß nicht nur Viskositätswerte gefunden wurden, die zwischen den Werten der reinen KCl- und CaCl_2 -Kurven lagen, wie dies bei einer einfachen Additivität der Ionenwirkungen erwartet werden müßte. Es zeigte sich vielmehr, daß die Meßwerte zum Teil höher liegen als diejenigen, die man nach Zusatz von äquivalenten Mengen von KCl allein erhält. Die beiden verschiedenartigen Kationen, von denen jedes für sich allein auf das Agarsol viskositätserniedrigend wirkt, hemmen sich also hier zum Teil in ihrem Vermögen, die Viskosität zu senken (Antagonismus). Zum Teil wurden aber auch Viskositätswerte gefunden, welche niedriger lagen als diejenigen, welche man nach Zusatz von CaCl_2 erhält. Bei bestimmten Mischungsverhältnissen verstärken sich Ca^{++} und K^+ also in ihrer viskositätserniedrigenden Wirkung, es besteht hier Sensibilisierung.

Der fließende Übergang von Antagonismus, Additivität und Sensibilisierung ist aus Abb. 2 ersichtlich. Auf der Ordinate ist die relative Viskosität η_{rel} auf der Abszisse die Gesamtkonzentration der Agarlösung an den Elektrolyten KCl und CaCl_2 im neg. log. Maßstab dargestellt. Die Parameter geben die jeweiligen Mischungsverhältnisse an.

Eine Sensibilisierung liegt vor bei Zusatz von Ca und K im Verhältnis 1 : 1. In niederen Konzentrationsbereichen (bis zu 2,0 Millival bzw. 2,70 neg. Log. der Äquivalentkonzentration) liegen die Viskositätswerte zunächst in der Mitte zwischen den Werten für CaCl_2 und KCl. Mit steigenden Konzentrationen nähern sich die Viskositätswerte dieser Kurve jedoch immer mehr der der CaCl_2 -Kurve. Diese wird bei einer Konzentration von 6,9 Millival (bzw. 2,16 neg. Log.) geschnitten, die Viskositätswerte liegen also bereits in einem verhältnismäßig niederen Konzentrationsbereich tiefer als die Viskositätswerte nach CaCl_2 -Zusatz. Die Kurve des Mischungsverhältnisses Ca : K = 1 : 1 erreicht die niedersten Viskositätswerte aller Mischungsverhältnisse. KCl und CaCl_2 verstärken sich also hier in ihrem Einfluß.

Bemerkenswert ist, daß sowohl durch eine Erhöhung des Calciumanteils eine geringere Viskositätserniedrigung bewirkt wird als auch durch eine Verschiebung des Calcium-Kalium-Verhältnisses zugunsten des Kaliumanteiles. Wird das Mischungsverhältnis nach der Seite des Calciums erweitert (Ca : K = 2 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 6 : 1, 10 : 1), so zeigt sich, daß sich der Kurvenverlauf mehr und mehr dem der Kurve für reines Calciumchlorid nähert. Bei einem Mischungsverhältnis Ca : K = 10 : 1 sind beide Kurven fast identisch.

Wird das Mischungsverhältnis zugunsten des Kaliums erweitert, so beobachtet man gleichfalls einen Viskositätsanstieg gegenüber den Werten der Kurve Ca : K = 1 : 1. Setzt man Ca : K im Verhältnis 1 : 2 zu, so liegt die Viskositätskurve in allen Punkten über der Kurve, die nach Zusatz von Ca : K = 1 : 1 erhalten wurde und läuft im wesentlichen mit dieser parallel. Auch hier erfolgt ein Schneiden der CaCl_2 -Kurve, jedoch erst in höheren Konzentrationen (10,4 Millival bzw. 1,98 neg. Log.). In Konzentrationen, die darüber hinausgehen, erreicht die Kurve Viskositätswerte,

die gleichfalls unter denen der reinen CaCl_2 -Kurve liegen. Es tritt also auch hier zunächst eine Additivität und danach eine Sensibilisation ein, welche jedoch nicht so ausgeprägt ist und erst in höherer Konzentration erscheint.

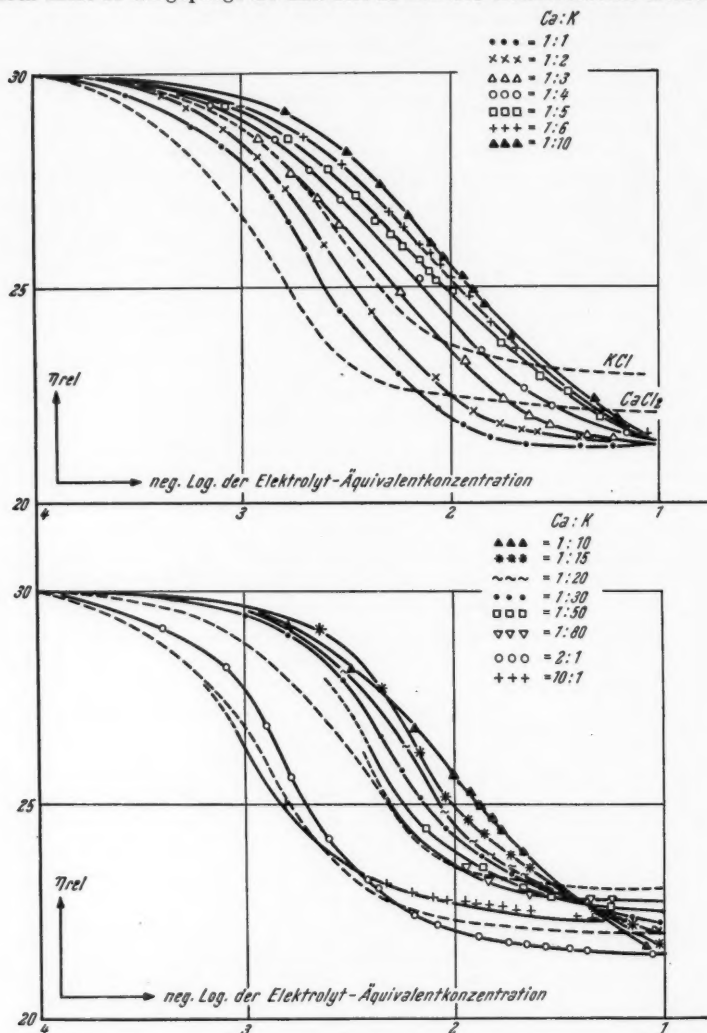


Abb. 2. Wirkung verschiedener Mischungsverhältnisse von $\text{CaCl}_2:\text{KCl}$ auf die Viskosität von Agarsol.

Bei Zusatz von $\text{Ca}:\text{K} = 1:3$ nimmt die Viskosität wiederum Werte an, die sämtlich über denen des Verhältnisses $1:2$ liegen und sich bis zu einer

Konzentration von 9,4 Millival bzw. 2,03 neg. Log. bereits mit denen der KCl-Kurve decken. In Konzentrationen, die darüber hinausgehen, erfolgt im Gegensatz zur KCl-Kurve, welche hier in den Abschnitt des konstant bleibenden Wertes übergeht, eine weitere Viskositätserniedrigung. Diese führt dazu, daß die CaCl_2 -Kurve geschnitten wird, und zwar bei einer Konzentration von 18 Millival bzw. 1,74 neg. Log. In höheren Konzentrationen liegen die Viskositätswerte wiederum unter denen der reinen CaCl_2 -Linie.

Bei einem Mischungsverhältnis $\text{Ca}:\text{K}=1:4$ tritt erstmalig ein Antagonismus auf, d. h. es ergeben sich Viskositätswerte, die über denen liegen, welche nach Zusatz von KCl erhalten werden. Bereits bei Zusatz der Elektrolyte im Mischungsverhältnis $\text{Ca}:\text{K}=1:5$ liegen die Viskositätswerte um ein beträchtliches über den Werten der KCl-Kurve. Diese werden erst in einer Konzentration erreicht, die bei 22 Millival bzw. 1,66 neg. Log. liegt. Die CaCl_2 -Kurve wird erst in hohen Konzentrationen (45 Millival bzw. 1,54 neg. Log.) unterboten. Es tritt hier also mit steigender Konzentration der Zusätze nacheinander Antagonismus, Additivität und Sensibilisierung auf.

Die antagonistische Wirkung von Ca und K verstärkt sich noch bis zu einem Mischungsverhältnis von $\text{Ca}:\text{K}=1:10$. Diese Kurve liegt in allen Werten noch über denen der Kurve des Mischungsverhältnisses $\text{Ca}:\text{K}=1:6$. Die Kaliumlinie wird erst bei 31,4 Millival und die Calciumlinie erst bei 60 Millival erreicht. Eine weitere Verstärkung der antagonistischen Wirkung der beiden Kationen tritt dann nur noch in niederen Konzentrationen der Zusätze in Erscheinung, während die Viskositätswerte in höheren Konzentrationsbereichen einen steileren Kurvenabfall ergeben. Die Viskositätskurve nach Zusatz von Ca:K im Mischungsverhältnis $1:15$ verläuft also bereits bei einer Konzentration von 5,0 Millival bzw. 2,3 neg. Log. unter der Kurve des Mischungsverhältnisses $\text{Ca}:\text{K}=1:10$.

Eine weitere Verschiebung des Calcium-Kalium-Verhältnisses zugunsten des Kaliums bewirkt eine allmähliche Annäherung des Kurvenverlaufes an die KCl-Kurve. Wird Ca und K im Verhältnis $1:80$ zugesetzt, so ist der Verlauf dieser Kurve mit dem der KCl-Kurve nahezu identisch.

Aus diesen dargelegten Befunden ist klar zu ersehen, daß die Bedeutung eines Ions für den Kolloidzustand nicht für sich allein präzisiert werden kann. Es kann also auch die stoffwechselphysiologische Wirkung eines Ions nur im Zusammenwirken mit den anderen Nährelementen verstanden werden. Nur wenn man die kolloidchemische Vorgeschichte des Plasmas in die Beurteilung einbezieht, d. h. die Einwirkungen wertet, welche bereits vorhandene Elektrolyte verursachen, kann man die Bedeutung der Zufuhr weiterer Elektrolyte erfassen. Je nach dem bereits vorliegenden Hydratations- und Dispersitätsgrad wird die Reaktion auf eine Verschiebung der Ionenverhältnisse eine andere sein.

Ferner konnte mit den Untersuchungsbefunden gezeigt werden, daß durch eine geeignete Kombination verschiedener Elektrolytkonzentrationen von KCl und CaCl_2 eine Viskositätssteigerung gegenüber

den Zusätzen reiner Salze gleicher Konzentration erreicht werden kann.

Diese Abhängigkeit der Viskositätswerte vom jeweiligen Mischungsverhältnis der Ca^{++} - und K^{+} -Ionen wird besonders deutlich, wenn man sich durch Abb. 2 senkrechte Schnitte gelegt denkt und die Viskositätswerte vergleicht, die sich bei verschiedenen Mischungsverhältnissen, jedoch bei gleicher Elektrolytkonzentration ergeben. Die Resultate einer solchen Betrachtungsweise sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. Die Ordinate gibt die relative Viskosität η_{rel} wieder, während auf der Abszisse die Mischungsverhältnisse von $\text{Ca}:\text{K}$, in prozentuale Werte umgerechnet, aufgetragen sind. Die Parameter geben den neg. Log. der Elektrolyt-Äquivalentkonzentrationen an. Die Kurven verbinden also die Viskositätswerte der gleichen Elektrolytkonzentrationen in verschiedenen Mischungsverhältnissen. Der Calciumgehalt steigt von links nach rechts von 0–100%, umgekehrt der Kaliumgehalt von rechts nach links von 0–100%.

Wie aus dieser Figur ersichtlich ist, durchlaufen die Viskositätskurven je nach dem Mischungsverhältnis und der Konzentration der zugesetzten Elektrolyte Minimal- und Maximalwerte. Die Maximalwerte entsprechen der antagonistischen, die Minimalwerte der sensibilisierenden Wirkung.

Welches Mischungsverhältnis sich nun am günstigsten zur Erreichung hoher Viskositätswerte auswirkt, ist nicht ohne gleichzeitige Angabe der Konzentration der Zusätze zu sagen. Wie sich in Abb. 3 zeigt, äußert sich der Kationenantagonismus nicht unabhängig von der Elektrolytkonzentration, d. h. das Mischungsverhältnis entscheidet nicht allein über das Auftreten von Maximalwerten. Es zeigt sich vielmehr, daß der Maximalwert bei jeder Elektrolytkonzentration bei einem etwas anderen Mischungsverhältnis liegt.

So ist in niederen Konzentrationen dieses Maximum des ausgeprägtesten Ionenantagonismus mehr nach der Seite des Kaliums verschoben ($\text{Ca}:\text{K} = 1:30$) als in höheren Elektrolytkonzentrationen (Maxima bei $\text{Ca}:\text{K} = 1:6$). Dazwischen liegen in mittleren Konzentrationsbereichen alle Übergänge.

Im einzelnen liegen die Viskositätsmaxima der verschiedenen Konzentrationen in folgenden Mischungsverhältnissen:

Elektrolytkonzentration (neg. Log.)	Maximalwert beim Mischungsverhältnis $\text{Ca}:\text{K}$
3,2	1 : 30
3,0	1 : 20
2,8	1 : 15
2,6	1 : 15
2,4	1 : 15
2,2	1 : 10
2,0	1 : 10
1,8	zwischen 1 : 10 und 1 : 6
1,6	zwischen 1 : 10 und 1 : 6

Diese Ergebnisse sind zweifellos für die Ausarbeitung von Richtlinien für eine geeignete Düngung mit Kalium und Calcium von praktischer Bedeutung.

Es ist anzunehmen, daß auch der Maximalwert der Plasmaviskosität in Abhängigkeit von der Düngung bei jeder Höhe der Mineraldünger-

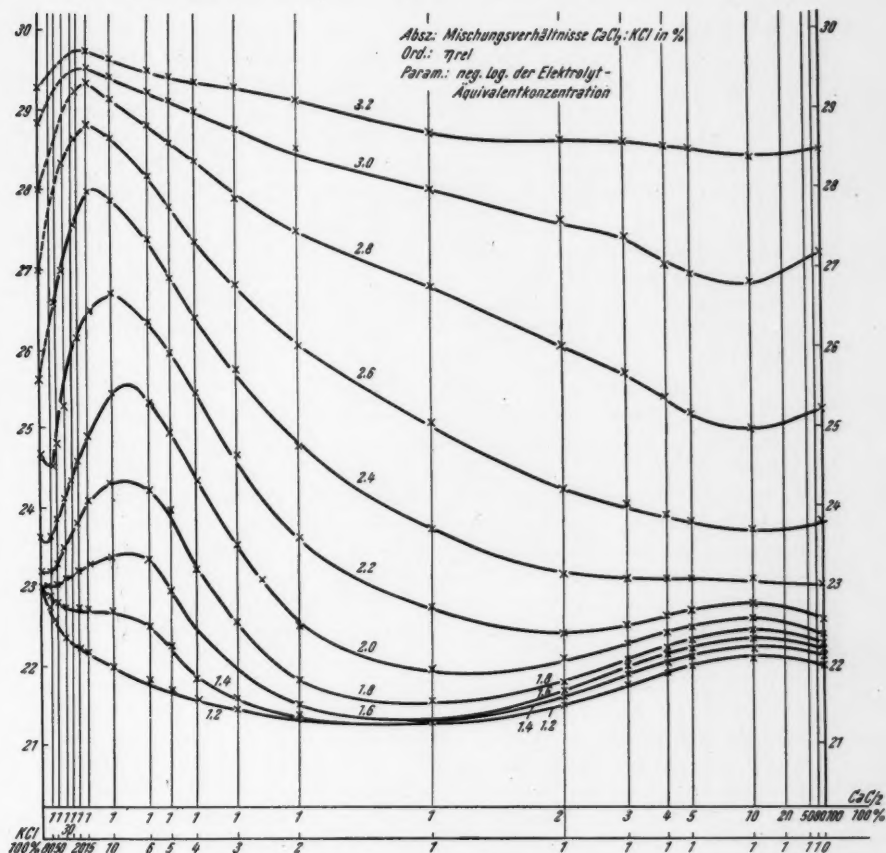


Abb. 3: Wirkung verschiedener Mischungsverhältnisse von $\text{CaCl}_2:\text{KCl}$ auf die Viskosität von Agarsol.

gaben in einem etwas anderen Mischungsverhältnis von Ca:K liegt. Bei geringen Mengen von Kalium-Calcium-Zusätzen (niederer Salzgehalt des Bodens vorausgesetzt) muß zur Erreichung des Viskositätsmaximums ein relativ höherer Kaliumanteil in der Gesamtdüngermenge vorhanden sein als bei hohen Gaben.

Die in den meisten Monographien über Pflanzenphysiologie und vielen Originalarbeiten über mineralische Pflanzenernährung angegebene günstige Wirkung, welche das Kalium unter gewissen Bedingungen auf die Hydratation und das Wasserhaltevermögen des Pflanzenplasmas ausübt, und die antagonistische Wechselbeziehung, in der das Kalium zum Calcium steht, finden in den dargelegten Untersuchungsergebnissen ihr kolloidchemisches Gegenstück.

Unter der Voraussetzung, daß ein viskoses Plasma typisch für Zellen dürreresistenter Pflanzen ist, entsprechen die Maximalwerte der Viskositätskurven dem günstigsten, die Minimalwerte dem ungünstigsten Plasmazustand in bezug auf die Resistenz gegen wasserentziehende Einflüsse.

In diesem Zusammenhang könnten möglicherweise noch folgende Befunde von Belang sein:

Eine Verschiebung des Calcium-Kalium-Verhältnisses zugunsten des Kaliums (bis zum Verhältnis $\text{Ca}:\text{K}=1:10$) wirkt stets viskositäts-erhöhend, und zwar am stärksten in den niederen bis mittleren Konzentrationsbereichen von 3,2 bis 2,6 neg. Log. der Äquivalentkonzentration (siehe Abb. 3).

In hohen Elektrolytkonzentrationen (entsprechend den unteren Kurven, 1,6, 1,4 und 1,2 neg. Log.) wirkt eine Erweiterung des Calcium-Kalium-Mischungsverhältnisses zugunsten des Kaliums kaum noch viskositäts-erhöhend.

Wird das Mischungsverhältnis $\text{Ca}:\text{K}$ sehr stark zugunsten des Kaliums erweitert, so ist auf der Kaliumseite der Kurven nach Überschreitung des Maximums ein steiler Viskositätsabfall zu verzeichnen, der um so eher beginnt, je höher die Elektrolytkonzentrationen (Nährstoffgehalt des Bodens) sind. Dieser Viskositätsabfall, hervorgerufen durch Kaliüberdüngung oder extremen Ca-Ionen-Mangel, bedeutet eine Verminderung der wasserhaltenden Kraft des Plasmas.

Vergleicht man die dargelegten Befunde der Viskositätsuntersuchungen mit denen, die Arland [1, 2] an Hand der Messungen der relativen Transpirationsintensität erhielt, so decken sich die Ergebnisse weitgehend. Wie Feldversuche von Arland ergaben, zeigt die Pflanze ein Transpirationsminimum stets dann, wenn zweckmäßig gedüngt wurde, d. h. bei einem richtigen Verhältnis der Nährstoffe zueinander. Es ist wahrscheinlich, daß die Ergebnisse der Viskositätsmessungen an die physikalisch-chemischen Ursachen dieses Transpirationsverhaltens heranzuführen.

Im Verlauf der Antagonismusstudien war noch eine andere Erscheinung zu beobachten, die möglicherweise ebenfalls mit den physiko-chemischen Grundlagen des Wasserhaushaltes der Pflanzen im Zusammenhang steht. Es handelt sich um die Feststellung, daß auch Säuren und Salze bzw. Basen und Salze einander antagonistisch beeinflussen können. Zur systematischen Untersuchung dieser Erscheinung kam eine Versuchsreihe zur Durchführung, die zum Ziele hatte, die unterschiedliche Kaliwirkung bei verschiedenen pH-Werten festzustellen.

Es wurde jeweils eine Serie mit den folgenden pH-Werten untersucht:

pH-Wert	=	5,1
" "	=	5,5
" "	=	5,8
" "	=	6,1
" "	=	6,9

Zu jeder Serie gehören ca. 20 verschiedene KCl-Konzentrationen.

Die unterschiedliche Kaliwirkung bei verschiedenen pH-Werten auf die Agarviskosität läßt der Kurvenverlauf der Abb. 4 deutlich erkennen. Auf der Ordinate ist η_{rel} , auf der Abszisse die KCl-Konzentration in Millival pro Liter im neg. log. Maßstab aufgetragen. Die Parameter geben den jeweiligen pH-Wert der Kurve an.

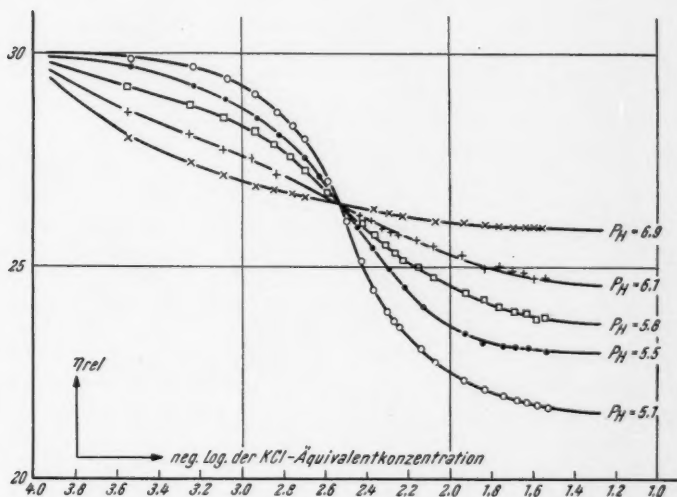


Abb. 4. Wirkung steigenden KCl-Zusatzes bei verschiedenen pH-Werten.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, ist das Agarsol in niederen Konzentrationsbereichen der KCl-Zusätze um so empfindlicher gegen K^+ -Ionen, je höher der pH-Wert ist. So liegen die Viskositätswerte der Kurve mit dem pH 6,1 unter denen der Kurve mit dem pH 5,1, d. h. das Agarsol antwortet auf KCl-Zusatz (niederer Konzentration) bei einem hohen pH-Wert mit einem steileren Viskositätsabfall als bei niederen pH-Werten. Das bedeutet, daß in niederen Konzentrationsbereichen des KCl-Zusatzes die OH^- - und K^+ -Ionen einander nicht hemmen, wie eigentlich zu erwarten wäre, sondern verstärken. Die Wirkung von H^+ - und K^+ -Ionen ist eine gegenteilige, d. h. sie wirken hemmend aufeinander. Dies zeigt sich in dem zunächst ausgesprochen flachen Viskositätsabfall bei der Kurve des pH-Wertes 5,1.

Auffällig ist, daß sich diese Verhältnisse in höheren KCl-Konzentrationsbereichen geradezu umkehren. Die Viskositätswerte der Kurve mit dem pH-Wert 6,9, welche zunächst, wie eben dargelegt, den steilen Abfall aufweist, zeigen mit steigenden KCl-Konzentrationen keine wesentliche Erniedrigung mehr und bleiben auf einem verhältnismäßig hohen Wert stehen. Mit sinkendem pH-Wert wird die Viskositätsdepression durch KCl-Zusätze immer ausgiebiger, so daß die Kurve des pH-Wertes 5,1 die tiefsten Viskositäten erreicht. Daraus kann entnommen werden, daß das Agarsol bei niederem pH-Wert gegen hohe KCl-Gaben am empfindlichsten ist, d. h. KCl bewirkt hier eine stärkere Viskositätserniedrigung als bei Annäherung an den Neutralpunkt. Das bedeutet, daß in höheren Konzentrationsbereichen sich OH^- und K^+ in ihrem Einfluß hemmen, dagegen K^+ und H^+ einander verstärken. Der sensibilisierende und antagonistisch wirkende Einfluß dieser Komponenten ist ein entgegengesetzter als der in niederen Konzentrationsbereichen.

Das wesentlichste Ergebnis dieser Untersuchungsreihe ist noch eine andere Beobachtung. Alle Kurven der verschiedenen pH-Werte gehen durch einen gemeinsamen Schnittpunkt, welcher bei einer KCl-Konzentration von 2,4 Millival und einem Viskositätswert von $\eta_{\text{rel}} = 26,5$ liegt. Die daraus zu ziehende Folgerung besagt, daß die Kaliumionenwirkung auf die Viskosität des Agarsols bei dieser KCl-Konzentration unabhängig vom pH-Wert ist.

Verbindet man in der Kurvenschar der Abb. 4 die Viskositätswerte, welche sich bei gleicher KCl-Konzentration, aber verschiedenen pH-Werten ergeben, durch senkrechte Schnitte, so erhält man Viskositätswerte, die auf Abb. 5 graphisch dargestellt sind. Die Parameter der Kurven zeigen die jeweilige KCl-Konzentration an (neg. Log.), die Abszisse gibt die pH-Werte, die Ordinate η_{rel} wieder. Bei dieser Darstellungsweise wird die Abhängigkeit der Kaliumionenwirkung vom pH-Wert besonders deutlich. Wie ersichtlich, erfolgt die in diesem Zusammenhang besonders interessierende Viskositätssteigerung mit abnehmenden pH-Werten bei niederen KCl-Konzentrationen und mit steigenden pH-Werten bei hohen KCl-Konzentrationen. Die annähernd waagrechte Linie der Abb. 5 bei der Kaliumkonzentration von 2,5 bis 2,6 neg. Log. entspricht dem Schnittpunkt der Kurven in Abb. 4 und zeigt, daß die Viskosität in allen pH-Werten von 5,1 bis 6,9 praktisch konstant bleibt.

Zusammenfassend genannt, konnten folgende Wechselbeziehungen der Kaliumkonzentration und des pH-Wertes in der Einwirkung auf die Agarviskosität beobachtet werden:

Bei hohem pH-Wert ist die Viskosität wenig beeinflussbar durch hohe KCl-Zusätze (ab 5,0 neg. Log. der KCl-Äquivalentkonzentration).

Bei einem pH-Wert von 2,5 ist die Viskosität wenig beeinflussbar von Veränderungen des pH-Wertes.

Umgekehrt ist die Viskosität bei ausgesprochen niederem pH stark beeinflussbar durch Veränderungen der Kaliumionenkonzentration.

Bei hohen Konzentrationen der KCl-Zusätze ist die Viskosität stark beeinflussbar durch pH-Änderungen.

Physiologisch gesehen, würde diese wechselseitige Abhängigkeit bedeuten, daß stets eine Komponente der beiden Faktoren pH und pK eine um so größere Veränderlichkeit bzw. Beeinflußbarkeit der Plasmakolloide in bezug auf Viskosität und Wasserhaltevermögen bedingt, je mehr das Plasma unabhängig ist von Veränderungen des anderen Faktors. Diese an der Modellschubstanz gefundene Wechselbeziehung zwischen der Konzentra-

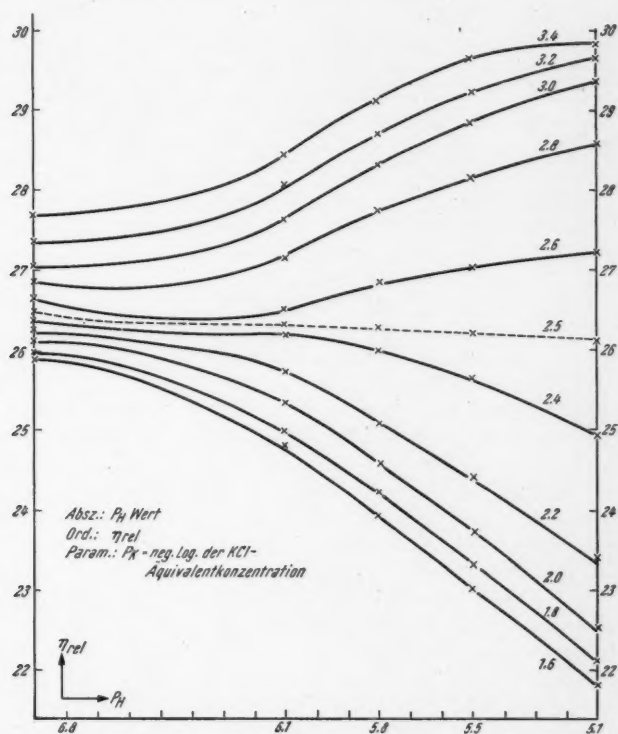


Abb. 5. Wirkung steigender pH-Werte bei verschiedenen (jeweils konstanten) KCl-Konzentrationen auf die Viskosität von Agarsol.

tion des KCl-Zusatzes und dem pH-Wert kann als Kolloidanaloga für bisher wenig erforschte Stabilisierungsmechanismen von Bedeutung sein.

Es ist naheliegend, auch für das Pflanzenplasma eine ähnliche Abhängigkeit der Kaliumionenwirkung vom pH-Wert anzunehmen wie für die Viskosität der Modellschubstanz. Daher erhält die festgestellte Beobachtung, daß bei einer bestimmten mittleren KCl-Konzentration sich die Viskosität als weitgehend unabhängig vom pH-Wert erweist, ohne Zweifel eine physiologische Bedeutung.

Die hohe Stabilität der Plasmakolloide gegen pH-Änderungen in einer ganz bestimmten Belegung der Kolloidmizelle mit K^+ -Ionen sowie die geringe Beeinflussbarkeit der Plasmaviskosität durch Änderung der Kaliumionenkonzentration bei hohen pH-Werten kann insofern für die Pflanze lebenswichtig sein, als es dadurch bis zu einem gewissen Grade möglich ist, unabhängig von den zufälligen Schwankungen der Außenweltbedingungen einen gleichmäßigen Quellungszustand der Plasmakolloide aufrechtzuerhalten. Dies ist deshalb wesentlich, weil jede Veränderung im Quellungsgrad des Plasmas gemäß den Darlegungen in der Einleitung von Einfluß sowohl auf die Stoffaufnahme als auch auf den Ablauf und die Geschwindigkeit der im Plasma stattfindenden chemischen Reaktionen ist.

Die OH^- - und H^+ -Ionen üben unter sämtlichen Ionen die stärkste Wirkung auf die Viskosität aus, wie aus Abb. 1 ersichtlich ist. Diesen Ionen kommt auch mit Wahrscheinlichkeit die stärkste Wirksamkeit auf das Gefüge des Plasmas zu. Nun ist der pH-Wert im Plasma außerordentlichen Schwankungen unterworfen, da er von Veränderungen der Atmungsintensität abhängig ist. Ihr sprunghaftes Ansteigen wird hervorgerufen durch beginnende Keimung, Wachstum, Verwundung, Reizung usw. Ebenso beeinflusst die Temperatur die Intensität der Atmung. Alle diese Faktoren würden somit befähigt sein, gleichzeitig mit der Reaktionsverschiebung des Protoplasmas eine Veränderung des Quellungszustandes und damit der Wasserführung der Gewebe herbeizuführen, wenn nicht bei einer ganz bestimmten Belegung der Plasmakolloide mit K -Ionen in einer eng begrenzten Konzentration sich das Plasma in einem Zustand befinden könnte, in dem es unabhängig von diesen Schwankungen des pH-Wertes ist.

Ebenso wie die angeführten Stabilisierungsmöglichkeiten kann umgekehrt auch eine starke Beeinflussbarkeit der Plasmakolloide durch pH-Verschiebungen von Bedeutung sein. In der Modellsubstanz tritt ein derartiger starker Viskositätsanstieg bei hoher K^+ -Konzentration (pK 2,4 bis 1,6, Abb. 5) mit steigendem pH auf. Diese Beobachtung steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Bewegungsmechanismus der Schließzellen. Im Plasma dieser Zellen tritt bereits bei schwacher Belichtung ein pH-Anstieg ein, der durch die CO_2 -Assimilation der Chloroplasten und den damit verbundenen Entzug des CO_2 aus der Zelle bewirkt wird. Die kolloidchemischen Folgen dieses pH-Anstieges äußern sich besonders in einer Erhöhung der Permeabilität des Plasmas für H_2O . Die Permeabilitätserrhöhung geht nach Hoerber [6] symbar mit dem Quellungsstand und wird gleich dem Viskositätsverhalten durch eine Erhöhung des Hydratationsmaximums auf dem Wege über die Ladungshöhe erklärt. Durch die Erhöhung der Permeabilität strömt mehr Wasser in die Schließzellen, der Turgor in ihnen steigt und führt zur Öffnung der Spalte (etwa innerhalb 30 Min.). Diese Reaktion wird noch dadurch verstärkt, daß der pH-Anstieg eine Aktivierung der Amylase bewirkt, welche einen Teil der Assimilationsstärke in Zucker verwandelt, wodurch eine Erhöhung der Konzentration des Zellsaftes eintritt. Die Folge davon ist ein weiterer Wassereinstrom von den Nebenzellen in die Schließzellen und mag gleichfalls eine Öffnung der Spalten mit verursachen. Bei Verdunklung des Blattes

tritt eine gegenseitig verlaufende Reaktion ein. Durch die Stilllegung der Assimilation bei Dunkelheit wird ein CO_2 -Anstieg bewirkt, gleichzeitig erniedrigt sich der pH-Wert des Plasmas der Schließzellen. Es sinkt die Permeabilität, auch die Amylase wird wieder inaktiviert, so daß es zu einer Stärkekondensation in den Chloroplasten und Abnahme der Zuckerkonzentration des Zellsaftes der Schließzellen kommt. Dieses zieht eine Senkung des Turgors und Schließung des Spaltes nach sich.

Zusammenfassung

Es wurde versucht, zu Untersuchungsergebnissen von Viskositätsmessungen an Agarsolen Parallelen aus dem physiologischen Bereich zu ziehen. Dadurch sollte deutlich gemacht werden, daß Wechselbeziehungen zwischen dem kolloidchemischen Zustand des Plasmas und der Kationenbelegung dieser Plasmakolloide einerseits und der physiologischen Aktivität und dem Erwerb oder Vorhandensein einer Resistenz gegen Austrocknung und Kälte andererseits bestehen.

Die dargelegten Untersuchungsbefunde dienen zwar zunächst nur der Erweiterung von Erkenntnissen über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Pflanzenphysiologie. Fortschritte auf diesem Gebiet waren jedoch schon oft die Ursache zu neuen Erfolgen auf dem Gebiet des Pflanzenbaues. Die ermittelten Zusammenhänge zwischen der Ionenwirkung und der Viskosität können, auf den Kolloidzustand des Plasmas übertragen, die kausalen Beziehungen zwischen Dürreresistenz und Düngung aufklären helfen. Wenn auch die tatsächlichen Vorgänge im Pflanzenplasma komplizierter und komplexer als die hier dargelegten Befunde sein werden, so bieten diese vielleicht doch Anhaltspunkte zur Erforschung der physiko-chemischen Grundvorgänge an den Zellkolloiden, die sich bei der Einwirkung von Elektrolyten (in Form von Mineraldüngemitteln) an den kolloiden Plasmastrukturen abspielen.

Von praktischer Bedeutung könnten die Untersuchungsergebnisse insofern sein, als es gelang, Wege aufzuweisen, wie durch eine geeignete Kombination der antagonistisch sich beeinflussenden Ionen K^+ und Ca^{++} sowie K^+ und H^+ bzw. OH^- eine Erhöhung der Viskosität gegenüber den Viskositätswerten nach Zusatz einzelner Salze gleicher Konzentration erreichbar ist. Im Sinne der Pflanzenphysiologie gilt eine Erhöhung der Plasma-viskosität als kolloidchemische Ursache für die Erscheinung der Dürreresistenz, und es dürften aus diesem Grunde die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen als richtungsweisender Beitrag für Düngemaßnahmen mit Kalium und Calcium zu werten sein.

Die wichtigsten Meßergebnisse der Viskositätsuntersuchungen

1. Der Zusatz einzelner Elektrolyte zu Agarsolen ergab in allen untersuchten Fällen eine mehr oder weniger starke Viskositätserniedrigung, die von der Valenz des zugesetzten Kations abhängig ist und im wesentlichen auf Unterschiede in der ionischen Hydratation zurückgeführt werden kann.

2. Durch geeignete Kombination der Elektrolytkonzentrationen von KCl und CaCl_2 ist eine Viskositätssteigerung gegenüber den Zusätzen reiner Salze erreichbar. Es wurden Kolloidanaloga für die in der Physiologie maßgeblichen antagonistischen Wirkungen der K^+ - und Ca^{++} -Ionen aufgezeigt.

3. Die Viskositätswerte in ihrer Beeinflussbarkeit von Elektrolytkombinationen durchlaufen, je nach dem Mischungsverhältnis und der Konzentration der zugesetzten Elektrolyte, Minimal- und Maximalwerte. Der Maximalwert entspricht dem günstigsten, der Minimalwert dem ungünstigsten Quellungszustand des Pflanzenplasmas, von dem wiederum die Dürre-resistenz und der Ertrag der Pflanzen abhängig ist.

4. Die Wirkung des KCl-Zusatzes ist abhängig vom pH-Wert. Dadurch ergibt sich ein Zusammenhang mit der Physiologie des Atmungsstoffwechsels und dem Bewegungsmechanismus der Schließzellen.

Literatur

- [1] Arland, A., 1947: Die Deutsche Landwirtschaft 1, 145.
- [2] — 1955: Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde 28, 172.
- [3] Einstein, A., 1906: Ann. Physique 19, 289.
- [4] Fuchs, H. W., 1935: Ernährung der Pflanze 31, 233.
- [5] Henkel, P. A., 1946: Die Dürre-resistenz der Pflanzen und die Wege zu ihrer Steigerung. Band I und II. Verlag der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau u. Leningrad.
- [6] Höber, R., 1926: Physikal. Chemie der Zellen und Gewebe, 6. Aufl. Leipzig, S. 238, 337, 665.
- [7] Markert, S., 1953: Untersuchungen über den Einfluß von Elektrolyten auf die Viskosität von pflanzlichen Solen. Diss. Leipzig.
- [8] Newton, R., und W. M. Martin, 1931: Biedermanns Zentralblatt für Agrikulturchemie A I, 374.
- [9] Pisek, A., 1952: Die Naturwissenschaften 39, 4.
- [10] Ruhland, W., und W. Kessler, 1938: Planta 28, 159.
- [11] Schmidt, H., 1939: Protoplasma 33, 25.
- [12] Schmidt, H., K. Diewald und O. Stocker, 1940: Planta 31, 559.
- [13] Seible, D., 1939: Beiträge zur Biologie der Pflanzen 26, 289.
- [14] Smoluchowski, v., 1916: Kolloid-Zeitschrift 18, 190.
- [15] Stocker, O., 1947: Die Naturwissenschaften 34, 362.
- [16] Strugger, S., 1939—1946: Naturforschung und Medizin 52, I, 36.
- [17] Tsuda, S., 1928: Kolloid-Zeitschrift 45, 325.
- [18] Weigert, J., und H. Weizel, 1936: Prakt. Blätter der bayr. Landesanstalt f. Pflanzenbau und Pflanzenschutz XIV, 91.

Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von *Helodea densa*

Von

Josef Böing

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. Westf.

Mit 10 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Januar 1955)

I. Einleitung

Genetische Untersuchungen — besonders von Baur (1930) und Renner (1934) — haben gezeigt, daß ein kernunabhängiger Plastidenerbgang besteht und daß den Plastiden somit Individualitätscharakter im Sinne Schimpers (1883) zuerkannt werden muß. Aus dieser Erkenntnis heraus stellen die Plastiden ein kontinuierliches System dar. Sie müssen in meristematischen Geweben sich durch Wachstum und Teilung vermehren und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt werden. Durch Untersuchungen an den Proplastiden in Meristemen mono- und dikotyler Landpflanzen konnte Strugger (1950, 1953, 1954) feststellen, daß dem Plastidenstroma stets ein primäres Granum eingelagert ist. An entsprechend fixierten und gefärbten Mikrotompräparaten konnte er fernerhin den Teilungsvorgang an den Proplastiden beschreiben. Auch die Verteilung der Proplastiden bei der Zellteilung konnte von Strugger (1954 a u. b) beobachtet werden. Die Teilung der Proplastiden geht so vor sich, daß das scheibchenförmige primäre Granum sich der Fläche nach identisch reproduziert und die Tochtergrana auf zwei Stromahälften verteilt werden, welche sich durch Einschnürung trennen. Da Strugger in jedem Proplastid ein primäres Granum feststellen konnte und sein Verhalten bei der Teilung an Mikrotomschnitten festlegte, stellte er die Theorie von der Kontinuität der Granastrukturen für die höheren Landpflanzen auf. Bei der Differenzierung des embryonalen Proplastids zum fertigen somatischen Chloroplasten gibt Strugger an, daß die sekundären Grana aus dem primären Granum gebildet werden.

Im Widerspruch zu den Befunden Struggers bestreiten Heitz und Maly (1953) das kontinuierliche Vorkommen des primären Granums in den Proplastiden und seine Fähigkeit zur identischen Reproduktion. Sie

treten vielmehr für eine Neubildung der Grana aus dem Plastidenstroma ein.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Beobachtungen, die Strugger über die Teilung des primären Granums und des Stromas an fixiertem Material gemacht hat, durch Vitaluntersuchungen zu prüfen und die Frage nach der Entstehung der sekundären Grana aus dem primären Granum besonders eingehend zu untersuchen.

Als Untersuchungsobjekt dienten die etiolierten Blätter von *Helodea densa*, deren Plastiden in wesentlichen Eigenschaften eine Übereinstimmung mit den Proplastiden zeigen (vgl. Strugger 1937 b). Da die etiolierten Plastiden in allen Teilen größer sind als die Proplastiden, war zu hoffen, daß sich die Vorgänge, die sich am primären Granum abspielen, hier leichter beobachten ließen. Zum Vergleich wurden auch sehr junge Knospenblätter von nicht etiolierten Pflanzen untersucht.

Die Vitaluntersuchungen an den etiolierten und ergrünenden Blättern wurden in der Regel in einem Tropfen Leitungswasser vorgenommen. Nur bei längerer Beobachtungsdauer (bis zu 12 Stunden) wurde 0,15 mol. sterile Glukoselösung verwendet und das Deckglas mit Paraffinöl umrandet. Auch eine Vitalfärbung mit Rhodamin B in Leitungswasser 1 : 1000 (vgl. Strugger 1937) wurde für die Darstellung der Grana verwendet. Es muß jedoch ausdrücklich bemerkt werden, daß eine Rhodamin-B-Färbung nur an herangewachsenen Blattgeweben wegen der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse möglich ist. Die Färbedauer betrug 1–4 Stunden; an die Färbung schloß sich eine Wässerung von 15–20 Minuten an. Zur Steigerung der Kontrastwirkung wurde nach Rhodamin-B-Färbung ein Grünfilter benutzt. Zu Vergleichszwecken wurde mit 2%iger Osmiumsäure fixiertes und mit Säurefuchsin gefärbtes Material herangezogen.

Für die Untersuchungen stand ein Leitzsches Forschungsmikroskop, Stativ BST, mit $\frac{1}{12}$ homogener Ölimmersion numer. Apertur 1,30 und $\frac{1}{16}$ Fluorit numer. Apertur 1,32, zur Verfügung. Als Beleuchtungsquelle diente die Niedervolt-Mikroskopierlampe von Zeiß-Winkel; für fluoreszenzoptische Untersuchungen wurde die Fluoreszenzmikroskopierleuchte von Zeiß-Winkel mit der Quecksilberhöchstdrucklampe S 81 der Quarzlampen G. m. b. H., Hanau a. M., verwendet.

II. Mikroskopischer Nachweis des primären Granums in etiolierten Blättern

Zur Anzucht des etiolierten Materials hat sich das von Strugger (1937) angegebene Verfahren bestens bewährt: 15–20 cm lange Sproßstücke von *Helodea densa* werden in flache Tonschalen gegeben, die, zu mehreren übereinandergestellt, mit einem Dunkelsturz bedeckt werden und einige Tage bis Wochen bei Zimmertemperatur (etwa 20° C) stehen bleiben. Bei der Präparation der etiolierten Blätter verfährt man zweckmäßig in der Weise, daß man zunächst einen Schnitt quer durch die Blattknospe macht. Die abgetrennten Blätter werden dann isoliert und die basal abgeschnittenen auf einen Objektträger in frisches Leitungswasser gebracht.

1. Proplastiden

Die Untersuchung von Proplastiden in der postmeristematischen Basiszone von 0,5–1 mm langen Blättchen, die während einer zweiwöchigen Dunkelkultur von *Helodea-densa*-Sprossen an den zugewachsenen Seitentrieben gebildet wurden, ergibt folgendes:

Im Hellfeld erscheinen die Proplastiden im ungefärbten lebenden Präparat als farblose, mehr oder weniger längliche Körper. Diese jungen Plastiden sind etwa 1–2 μ lang und 1 μ breit. In Größe und Form sind sie den Chondriosomen oft sehr ähnlich, doch lassen sie sich von diesen auf Grund ihrer amöboiden Formveränderlichkeit ohne weiteres unterscheiden. Infolge ungünstiger Lichtbrechungsverhältnisse ist es äußerst schwierig, in den ungefärbten Nativpräparaten das primäre Granum im pigmentfreien Zustand vom Stroma zu unterscheiden. Man erkennt es im günstigen Falle als kleines, je nach Lage mehr oder weniger rundes Scheibchen von 0,3 bis 0,6 μ Durchmesser. Präpariert man eine Blattknospe in der Weise, daß man die älteren Blätter entfernt und setzt die Knospe dann dem Tageslicht aus, so bilden sich im Verlaufe einiger Stunden grüne Blattpigmente. Diese werden in das primäre Granum eingelagert und erleichtern dadurch dessen Auffindung wesentlich. In vielen Fällen allerdings zeigt das ganze Proplastid einen schwachen Grünschimmer. Es ist dann nicht möglich, an Nativpräparaten das primäre Granum distinkt zu erkennen. Dagegen läßt sich nach Fixation durch sorgfältige Anfärbung das primäre Granum in allen Fällen nachweisen.

Versuche, durch Vitalfärbung der Meristeme mit Rhodamin B eine Kontrastierung des primären Granums intakter Zellen zu erreichen, blieben ohne Erfolg. Diese Tatsache ist aber keineswegs — wie Heitz und Maly es angeben — als ein Beweis für das Fehlen des primären Granums zu werten. Sie findet eine einfache Erklärung in der von Strugger (1937 a) beschriebenen Abhängigkeit der Rhodamin-B-Speicherung vom Alter der Zellen. Danach ist eine Speicherung nur in älteren Zellen möglich, nicht aber in ungeschädigten Zellen der postmeristematischen Blattzone. Lediglich in Zellen, die bei der Präparation des Blättchens geschädigt wurden, ist — besonders im Bereich der Mittelrippe — nach Rhodamin-B-Färbung eine schwache Differenzierung in Stroma und Grana zu beobachten.

Im Fluoreszenzmikroskop bleibt das Gesichtsfeld wegen des Fehlens von Chlorophyll vollkommen dunkel. Nach mehrstündiger Belichtung (2700 Lux) zeigen aber die Proplastiden der Blattbasis infolge der inzwischen eingetretenen Pigmentbildung eine ziegel- bis blutrote Fluoreszenz. Es lassen sich drei verschiedene Arten der Fluoreszenzlokalisierung in den Proplastiden unterscheiden: In vielen Fällen fluoreszieren die Proplastiden völlig homogen rot. In anderen Plastiden sieht man außerdem ein Granum verstärkt aufleuchten. Ganz vereinzelt ist die Fluoreszenz auf das primäre Granum beschränkt. Alle Formen sind durch vermittelnde Übergänge miteinander verbunden. Vergleichende Hellfeldbeobachtungen ergeben, daß in

vielen Fällen — wenn auch kaum sichtbar — ein primäres Granum auch dann nachweisbar ist, wenn das Proplastid homogen fluoresziert. Durch

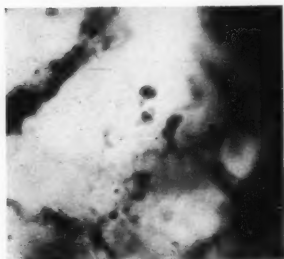


Abb. 1. Proplastiden aus der postmeristematischen Basiszone eines 0,7 mm langen etiolierten Blättchens. Elektive Granafärbung mit Säurefuchsin. Im mittleren Proplastid erkennt man die Scheibennatur des primären Granums.

Fixation und Färbung kann man das primäre Granum einwandfrei mikroskopisch darstellen. Aus diesem Grunde entspricht die von Heitz und Maly gezogene Folgerung, daß das primäre Granum im Zuge der Ergrünung aus dem Stroma entsteht, nicht den beobachtbaren Tatsachen. Das von Heitz und Maly aufgeworfene Problem kann sich daher nur auf die Frage beziehen, ob in einem ergrünenden Proplastid, in welchem ein primäres Granum präexistiert, das Chlorophyll zuerst im Stroma gebildet und dann ins Granum eingelagert wird oder ob das Chlorophyll im primären Granum ausnahmslos zuerst auftaucht. Da optische Phänomene die exakte Entscheidung erschweren können, muß auch hier noch diese Alternative offengelassen werden.

Nach Fixation und Färbung mit Hilfe der von Strugger (1950, 1953) angegebenen Verfahren läßt sich in allen Pro-

plastiden ein primäres Granum nachweisen. Seine Gestalt ist eindeutig als scheibchenförmig zu erkennen (Abb. 1).

Den gleichen Schwierigkeiten wie an etiolierten Blättchen begegnen die Versuche zur mikroskopischen Darstellung des primären Granums von Proplastiden an jungen Blättchen normal ergrünender Pflanzen. Die Beobachtungen stimmen mit denjenigen am etiolierten Material überein.

2. Etiolierte Plastiden

In der Spitzenzone etwa 5–7 mm langer Blättchen von Knospen, die sich in zweiwöchiger Dunkelkultur gebildet haben, sind die etiolierten Plastiden als amöboid formveränderliche Körper von $2\text{--}5 \times 2\text{--}3 \mu$ Größe zu erkennen. Sie sind in der Regel reichlich mit Stärke angefüllt. Gegenüber dem Proplastidengranum ist das Primärgranum etiolierter Plastiden im ungefärbten Nativpräparat wesent-

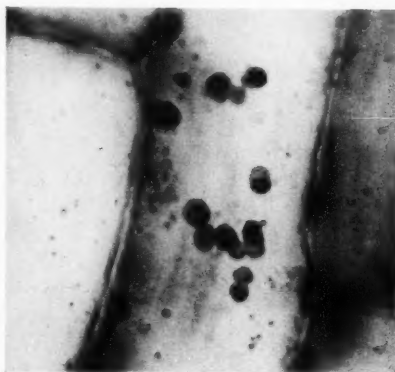


Abb. 2. Etiolierte Plastiden aus der Spitze eines 7 mm langen Blättchens. Granafärbung mit Neutralrot 1 : 1000.

lich leichter aufzufinden. Infolge seines Gehaltes an gelben Blattpigmenten hebt es sich sehr gut vom farblosen Stroma ab. Die Gestalt des primären Granums ist scheibchenförmig; der Durchmesser des Scheibchens beträgt etwa 1,2—1,6 μ . Zur Blattbasis hin ist eine kontinuierliche Abnahme in der Größe der Plastiden und des Granums sowie in der Pigmentierung des letzteren zu beobachten. Eine scharfe Grenze zwischen den Proplastiden und den etiolierten Plastiden besteht nicht.

Entsprechend der Fähigkeit älterer Zellen, Rhodamin B zu speichern, läßt sich in den etiolierten Plastiden der oberen Blatthälfte eine einwandfreie Differenzierung in Stroma und Granum durchführen. Die Kontrastwirkung wird durch Verwendung eines Grünfilters stark erhöht. Bei sorgfältiger Anfärbung mit Rhodamin B läßt sich auch in Plastiden mit reichlicher Stärkeakkumulation das Granum zur Darstellung bringen.

Im Fluoreszenzmikroskop leuchten in unbelichteten Blättern nur die stark gerbstoffhaltigen Schleimidioblasten, die unregelmäßig über das Blattfeld verteilt sind, in hellblauer Eigenfluoreszenz auf. Chlorophyllfluoreszenz tritt erst nach kurzer Belichtung (mehrere Minuten bis Stunden) der Blätter auf. Die blutrote Fluoreszenz geht in allen Fällen — wie Vergleiche mit dem Hellfeldbild eindeutig ergeben — nur vom primären Granum aus; das Stroma fluoresziert nicht.

Vergleiche an fixiertem und gefärbtem Material führen zu einer Bestätigung der beschriebenen Funde (Abb. 2).

III. Beobachtungen über die Teilung des primären Granums und des Stromas

Für die Untersuchungen über die Teilungsvorgänge an den monogranulären Plastiden der postmeristematischen Blattzone wurden etwa 5 mm lange Blättchen aus der unteren Knospenregion etiolierter Seitentriebe verwendet. Die Blättchen lassen sich ohne stärkere Schädigung von der Pflanze abtrennen und leicht etwa 8—12 Stunden in gutem Zustand erhalten. Sie wurden in 0,15 mol. Glukoselösung (Leitungswasser) gebracht und unter der Wasserstrahlpumpe entlüftet. Das Deckglas wurde mit reinem Paraffinöl umrandet, um eine Verdunstung der Glukoselösung zu verhindern. Schädigungen durch Sauerstoffmangel innerhalb der Beobachtungszeit wurden nicht festgestellt.

Infolge der Plasmaströmung war es nicht möglich, den gesamten Teilungsablauf an einem einzigen Proplastid zu verfolgen. Es gelang aber, wesentliche Teilphasen an einem Objekt zu sehen.

Die Beobachtung der verschiedenen Stadien der Proplastidenteilung führte zu einer Bestätigung der von Strügger (1950, 1953, 1954) an fixiertem Material beschriebenen Bilder (Abb. 3). Die Teilung der Proplastiden wird eingeleitet durch eine flächenhafte Reduplikation des primären Granums. Das in Profilansicht anfänglich strichförmige Granum wird dicker und erscheint schmal rechteckig bis nahezu quadratisch. Nach Vollzug der flächenhaften Reduplikation beginnen die beiden Tochtergrana auseinanderzuweichen. Sie sind dann als zwei dicht nebeneinanderliegende

parallele Scheibchen zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Proplastidenteilung rücken die beiden Tochtergrana stärker auseinander. Dabei kippt häufig eines der beiden Scheibchen um, so daß das eine Granum in Profil-, das andere in Flächenlage zu sehen ist. In diesem Stadium beginnt sich dann der Stromaleib einzuschnüren und vollzieht schließlich die Teilung in zwei Tochterplastiden, von denen jedes wieder ein Granum enthält.

In einem Falle gelang es mir, den Verlauf einer Granateilung *in vivo* zu beobachten. Bei der Durchmusterung einer Zelle aus der basalen Blattzone fiel ein Proplastid auf, dessen primäres Granum in Profilstellung als dickes Scheibchen sichtbar war. Bei der weiteren Beobachtung zeigte sich das Granum einmal in Flächenlage, dann wieder in Profilanlage. Nach etwa 20 Minuten waren deutlich zwei dicht nebeneinanderliegende Grana-scheibchen zu erkennen. Die von Strugger (1950, 1953, 1954) auf indirektem Wege an Mikrotomschnitten erschlossene Teilungsfähigkeit des primären Granums in der Fläche wird so durch Lebendbeobachtung bestätigt.

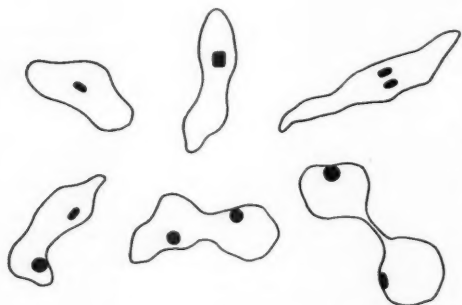


Abb. 3. Aufeinanderfolgende Stadien der Proplastidenteilung. Nach Vitalbeobachtungen am ungefärbten Präparat gezeichnet.

Häufig können die Teilungsprozesse des Stromaleibes wieder rückgängig gemacht werden, indem sich eingeschnürte Formen wieder abrunden. Solche Fälle sind aber wohl pathologischer Natur und durch Schädigungen irgendwelcher Art bedingt. Sie traten nach bestimmter Zeit auf, wenn die abgetrennten Blättchen länger als 18–24 Stunden unter dem Deckglas verweilten und sich bereits ein Sauerstoffmangel bemerkbar machte (vgl. Reinhard 1953).

Die Plastiden der Dauerzone etiolierter Blätter ließen keine Teilung des primären Granums erkennen.

IV. Beobachtungen über die Bildung der sekundären Grana

Die vorstehend mitgeteilten Ergebnisse zeigen deutlich, daß das primäre Granum ein kontinuierlicher Bestandteil der Proplastiden und der etiolierten Plastiden ist. Es bleibt nunmehr die Frage zu prüfen, wie sich das primäre Granum bei der Metamorphose zum polygranulären und assimilationspigmentführenden Chloroplasten verhält.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß das etiolierte Material auch unter konstanten Außenbedingungen unterschiedlich rasch eine Entwicklung der monogranulären Proplastiden zu den somatischen polygranulären Chloro-

plasten durchmacht, wurden die etiolierten Seitentriebe dem diffusen Tageslicht (2700—4000 Lux) ausgesetzt. Sprosse, die in der Dunkelkultur bis zu 8—10 Tagen alt geworden sind, ergrünen dann in etwa 1½ Tagen. In älteren Austrieben dagegen ist häufig erst nach 8 Tagen die normale Chloroplastenstruktur hergestellt.

Der Beginn des Ergrünungsprozesses zeigt sich zuerst durch eine leichte Grünfärbung der etiolierten Blätter an, die im günstigen Falle nach etwa 3—4 Stunden einsetzt. Im mikroskopischen Bild geht den Veränderungen am primären Granum ein Abbau der Stärke voraus. Dieser Stärkeabbau ist in der Regel abgeschlossen, bevor die polygranuläre Struktur in Erscheinung tritt. Es läßt sich dabei beobachten, daß die Stärke in der Blattspitze eher abgebaut ist als in der Blattbasis (vgl. Strügger 1937 b).

1. Die Entwicklung der Proplastiden in den postmeristematischen Zellen zu somatischen Chloroplasten

Etwa 8—12 Stunden nach Beginn der Belichtung ist der Ergrünungsprozeß so weit fortgeschritten, daß in der Profilansicht der inzwischen aus den Proplastiden entwickelten Jungchloroplasten zum erstenmal geldrollenartige Granareihen zu beobachten sind (Abb. 4). Die Zahl der Grana in einer solchen Reihe beträgt 2—4. Gelegentlich sind Komplexe von mehreren Grana zu sehen, die dicht aneinander liegen (vgl. Abb. 4, unten links). Es ist in diesen Fällen schwer zu unterscheiden, ob die Aufteilung des primären Granums durch Einschnürung oder durch flächenhafte Reproduktion und nachfolgendes Auseinanderschieben der sekundären Grana erfolgt ist. Diese liegen zunächst so dicht gepackt, daß sie bei Flächenlage des Plastids das Bild eines unregelmäßig konturierten primären Granums bieten. Sie weichen aber bald auseinander und verteilen sich im Stroma. Man kann dann an der Profilansicht der Plastiden manchmal zwei Granalagen unterscheiden, obzwar Unregelmäßigkeiten in der Verteilung vorkommen. Aus diesen Beobachtungen läßt sich erkennen, daß die sekundären Grana aus dem primären Granum entstehen.

Bei der Beobachtung dieses und auch des nächsten Stadiums mußte immer wieder festgestellt werden, daß in den weitaus meisten Fällen das gesamte Proplastid einen leichten Grünschimmer aufweist. Die Grana sind in der Regel nur undeutlich als etwas dunkler grün erscheinende Gebilde zu erkennen. Gelegentlich trifft man Plastiden an, deren Grana als distinkte Scheibchen im grünschimmernden oder — sehr selten — eindeutig farblosen Stroma sichtbar sind. Diese Beobachtungen legten den Gedanken nahe, daß möglicherweise in den frühen Stadien der Chloroplastenentwicklung auch im Stroma Chlorophyll auftritt. Eine fluoreszenzmikroskopische Überprüfung ließ diese Möglichkeit ebenfalls noch offen.

Heitz und Maly haben bei *Agapanthus umbellatus* in Proplastiden, welche soeben ergrünt, übereinstimmende Feststellungen gemacht. Sie schlossen aber aus ihren Beobachtungen, daß das primäre Granum als konstante Struktur zunächst im Proplastid nicht vorhanden sei und erst im

Zuge des Ergrünens die primären bzw. sekundären Grana gebildet würden. Wenn die vorliegenden Untersuchungen das Auftreten des Chlorophylls im Stroma in den Anfangsstadien des Ergrünens bestätigen, so konnte ich jedoch ein sekundäres Auftreten des primären Granums in keinem Falle



Abb. 4. Darstellung von frühen Ergrünungsstadien der Proplastiden nach lebendem Material.

beobachten. Das primäre Granum erwies sich bei den vorliegenden Untersuchungen durchaus als präexistierend. Die von Heitz und Maly aufgeworfene Problemstellung muß also dahin modifiziert werden, daß das

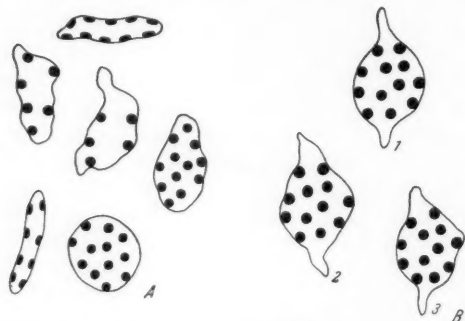


Abb. 5. A: Ergrünende Plastiden im Zustand einer zweischichtigen Granaanordnung. B zeigt die amöboide Formveränderlichkeit eines polygranulären Jungchloroplasten.

primäre Granum ein präexistierendes Strukturelement ist (vgl. Strugger 1950, 1953, 1954), daß aber im Zuge des ersten Ergrünens das Chlorophyll sowohl im Stroma als auch im primären Granum in Erscheinung tritt. Dann berührt aber die von Heitz und Maly aufgeworfene Streitfrage nicht mehr die Frage nach der Präexistenz des primären Granums.

Im weiteren Verlauf der Metamorphose verteilen sich die sekundären Grana schnell über die Fläche des Plastids (Abb. 5). In Profilsicht sind in allen beobachteten Fällen nur zwei Granaschichten vorhanden; allenfalls sieht man, daß eine dritte Schicht angelegt wird. Aus vier übereinandergelagerten Grana gebildete Reihen, die manchmal in den frühesten Stadien in Einzahl auftraten, fehlen. Aus

diesem Befund läßt sich wohl nur folgern, daß die anfangs beobachteten Geldrollen der Flächenausbreitung der Grana dienen. Jedenfalls ist klar zu erkennen, daß die Entwicklung der Granastruktur zunächst auf die Herstellung eines zweischichtigen Systems abzielt. In diesem liegen die Grana meistens noch nicht streng übereinander. — Diese Beobachtungen zeigen eine auffallende Übereinstimmung mit den Feststellungen, die K a j a (1954) an Mooschloroplasten gemacht hat. Nach den Befunden von K a j a stellt nämlich die zweischichtige Anordnung der Grana den Normalbau der Moosplastiden dar. Eine Geldrollenstruktur ließ sich für diese Anordnung ebenfalls nicht finden.

Die amöboide Formveränderlichkeit des Stromas ist im Zweischichtenstadium noch deutlich ausgeprägt. Sie ist am stärksten in den granafreien Teilen des Stromas. Des öfteren läßt sich in den granaführenden Teilen eine leichte Abrundung des Plastids feststellen, doch ist auch hier eine schwache Amöboidie noch durchaus beobachtbar (Abb. 5 b).

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung leuchten die Grana als distinkte Punkte

rot auf und heben sich deutlich vom schwach rot fluoreszierenden Stroma ab. Die „Fluoreszenz“ des Stromas ist nur innerhalb eines Bereiches zu sehen, der von den am weitesten abgewanderten sekundären Grana begrenzt wird. Daß im Stroma außerhalb dieses Bereiches keine rote Fluoreszenzfarbe auftritt, geht einwandfrei aus der Beobachtung der granafreien amöboiden Fortsätze hervor.

Die dritte Granaschicht — und das gilt auch für die folgenden — entsteht innerhalb der horizontalen Granalagen nicht gleichzeitig. Sie wird vielmehr in der Plastidenmitte begonnen und schreitet von hier zum Rande fort (Abb. 6). Die Grana sind zuweilen auch jetzt noch nicht über das gesamte Stroma verteilt. In diesen Fällen ist noch eine mehr oder weniger starke Formveränderlichkeit vorhanden. Sobald eine vierte Granaschicht angelegt ist, hat die Amöboidie ihr Ende erreicht. Die jungen Chloroplasten sind dann in ihrer Gestalt den erwachsenen völlig gleich.

Es ist auffallend, daß die Zahl der Teilungsformen in den ergrünenden Zellen bedeutend größer ist als in unbelichteten Blättern. Die Teilungen werden noch während der amöboiden Phase der ergrünenden Plastiden eingeleitet. Vielfach ist der Ergrünungsvorgang eher abgeschlossen als der Teilungsprozeß. Die Biskuitformen ergrünter Chloroplasten, an denen eine amöboide Beweglichkeit nicht mehr festzustellen ist, sind wohl zum Teil auf solche verschleppte Teilungen zurückzuführen. Die Zahl der Grana in den beiden Tochterhälften eines in Teilung begriffenen ergrünenden Pla-



Abb. 6. Dreischichtige Stadien ergrünender Plastiden. Nach Vitalbeobachtungen am ungefärbten Material.

stids ist zwar nicht immer gleich groß, doch ist allgemein festzustellen, daß jedem Tochterplastid etwa die Hälfte der vorhandenen sekundären Grana zugeteilt wird.

Durch vergleichende Untersuchungen an normal ergrünendem Material wurden genau entsprechende Ergebnisse erhalten. Die Plastidenmetamorphose verläuft hier aber schneller als in solchen Trieben, die nach Etiollement ergrünen. Aus diesem Grunde ist zuvor etioliertes Material für die Untersuchung der Plastidenergrünung besser geeignet.

2. Die Entwicklung etiolierter Plastiden der Zellen der Dauerzone zu somatischen Chloroplasten im Licht

Die Vorgänge, die sich in den frühesten Entwicklungsstadien etiolierter Plastiden abspielen, bestehen im Prinzip darin, daß sich das $1,2\text{--}1,6\ \mu$ große primäre Granum zerfallsartig in eine größere Zahl sekundärer Grana aufteilt, die in allen beobachteten Fällen bereits die endgültige Größe ($0,3\text{--}0,4\ \mu$) besitzen. In Blättern aus 10–14-tägigen Dunkelkulturen geht die Aufteilung sehr rasch vor sich; sie ist abgeschlossen, bevor die ersten sekundären Grana sich im Stroma gleichmäßig verteilen. Dagegen ist in Blättern aus 2–3 Wochen alten Dunkelkulturen eine leichte Hemmung der Metamorphose festzustellen, die sich besonders auf die Aufteilung des primären Granums auswirkt. Dadurch bietet sich eine gute Möglichkeit, die einzelnen Stadien genauer zu verfolgen. Die Beobachtungen, die teils an ungefärbten, teils an vitalgefärbten Präparaten gemacht wurden, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Nach etwa 6–10-stündiger Belichtung erscheint das primäre Granum unregelmäßig, fast eckig konturiert. Bald darauf heben sich die Ecken durch etwas stärkere Lichtbrechung vom übrigen Teil des Granums ab. Dieser Eindruck verstärkt sich im Laufe der nächsten Stunden immer mehr. Schließlich erscheinen an diesen Stellen die ersten sekundären Grana; insgesamt sind es meistens 4–6 (Abb. 7 u. 8).

Um jeden Irrtum auszuschließen, wurden die Untersuchungen an zahlreichen Präparaten wiederholt. Dabei ergab sich immer wieder eine Bestätigung des beschriebenen Befundes. Es kann deshalb festgestellt werden, daß die sekundären Grana stets aus der Substanz des primären Granums hervorgehen.

Im weiteren Verlauf der Metamorphose treten die sekundären Grana bald über den Rand des restlichen Teiles des Primärgranums hinaus. Dabei kann man vielfach ein Umkippen der sekundären Grana beobachten, und in diesen Fällen ist ihre Scheibchengestalt klar zu erkennen. Gelegentlich sind die umgekippten Grana spiralig um das primäre Granum herum angeordnet. Im Zusammenhang mit der Abwanderung der ersten sekundären Grana erfolgt eine weitere Aufteilung des primären Granums.

In der Profilstellung der Plastiden sieht man, daß die sekundären Grana jeweils zu mehreren dicht übereinanderliegen und geldrollenartige Reihen bilden, die in verschiedenen Abständen quer durch das primäre Granum

verlaufen (Abb. 8). Nach Vitalfärbung mit Rhodamin B heben sich diese Reihen dunkler ab. Wenn nun die sekundären Grana beginnen, sich voneinander zu lösen, werden die Reihen aufgelockert. Man kann dann die einzelnen Grana unterscheiden und feststellen, daß je 2—4 übereinander liegen.

Die Abwanderung der übereinanderliegenden sekundären Grana ins Stroma erfolgt nicht immer gleichmäßig nach allen Seiten. Man kann an Plastiden, die sich in Flächenlage befinden, beobachten, daß die sekundären Grana vielfach nach bestimmten Richtungen ausscheren. Sie schieben sich dabei flächenparallel übereinander hinweg ins Stroma (Abb. 9). Da die Abstände der sekundären Grana häufig unterhalb der Grenze der mikroskopischen Auflösbarkeit liegen, entsteht der Eindruck, als ob von den Ecken des primären Granums aus Fäden zum Plastidenrand verliefen. Sehr oft kommt es vor, daß einzelne Grana umgekippt sind und bei Flächenansicht des Plastids in Profilstellung erscheinen. Das trifft vor allem für diejenigen Grana zu, die in der Nähe des Plastidenrandes liegen.



Abb. 8. Frühe Ergrünungsstadien von etiolierten Plastiden in Profilansicht. Nach Beobachtungen am vitalgefärbten Material gezeichnet.



Abb. 7. Aufteilung des primären Granums und Abwanderung der sekundären Grana. Mikrophotographie eines mit 2%iger Osmiumsäure fixierten und mit Neutralrot 1 : 1000 gefärbten Präparates.

Die Verteilung der sekundären Grana über die gesamte Fläche des Stromas schreitet unter ständiger Aufteilung des primären Granums bzw. unter Auflösung des Sekundärgrana-Haufens schnell voran. In der Flächenansicht ergibt sich häufig das Bild, daß die sekundären Grana bevorzugt am Plastidenrand entlang sich ausbreiten, während die ausgesparte Fläche später aufgefüllt wird (Abb. 10). In Profilansicht läßt sich das kleiner werdende primäre Granum bzw. der Sekundärgrana-Komplex ebenfalls noch lange Zeit feststellen. Die Geldrollenstruktur wird schon vor der vö-

lligen Verteilung der sekundären Grana im Stroma hergestellt. Es läßt sich dabei in fast allen Fällen beobachten, daß die im Bereiche des primären Granums gelegenen Reihen zunächst eine größere Granazahl aufweisen als diejenigen in der Nähe des Plastidenrandes. Die Teilung der randständigen Grana führt aber ebenfalls weiter zur Bildung von Reihen.

In ergrünenden Plastiden aus langandauernden Dunkelkulturen kann zwischen der Aufteilung des primären Granums und der Abwanderung und Vermehrung der sekundären Grana (d. h. dem Übergang zum normalen Struktur Aufbau) ein Zeitraum bis zu 2 Tagen liegen. Durch die lange Dauer des Lichtentzuges sind offenbar so starke Schäden eingetreten, daß es erst eines längeren Erholungsstadiums bedarf, bevor die weitere Entwicklung vor sich gehen kann.

Im Verein mit der Entwicklung der etiolierten Plastiden zu assimilationstüchtigen Chloroplasten ist ein fortgesetzter Rückgang der amöboiden Formveränderlichkeit des Stromas zu beobachten. Ein strenger Zusammenhang zwischen dem Abklingen der Amöboidie und dem jeweiligen Grana-bau besteht offensichtlich nicht. Es hat sich vielmehr herausgestellt, daß starke individuelle Unterschiede auftreten und daß die Dauer der Dunkelkultur eine große Rolle spielt.

3. Versuche über den Einfluß des Rhodamin B auf die Metamorphose monogranulärer Plastiden

Nach der von Strügger (1937 a) vorgeschlagenen Nomenklatur ist das Rhodamin B ein inturbanter Farbstoff, weil eine Anfärbung keine mikroskopisch sichtbare Schädigung der Zelle hervorruft. Pflanzen, die mit Rhodamin B vorsichtig angefärbt werden, wachsen bei Weiterkultur in farbstofffreiem Medium ungestört weiter. Eine Ergrünungsfähigkeit ist aber erst dann festzustellen, wenn der Farbstoff in reinem Leitungswasser oder in stark verdünnten Rhodaminlösungen aus den Plastiden ausgewaschen ist. Die Ergrünung ist dann jedoch stark verzögert. Eigene Beobachtungen ergaben eine Bestätigung dieser Befunde.

Pirson und Alberts (1940) machten gegen die Einstufung des Rhodamin B als inturbanter Farbstoff geltend, daß einige Zeit nach der Anfärbung eine Assimilationshemmung auftritt. Diese beruht aber, wie Untersuchungen von Gessner (1941) zeigten, auf einem photodynamischen Effekt und nicht auf einer direkten Giftwirkung des Rhodamin B. Andererseits beobachtete Schmidt (1952) bei Kulturversuchen in Rhodaminlösungen von *Helodea*-Sprossen eine pathologische Streifung der Chloroplasten, die nicht durch eine photodynamische Wirkung erklärt werden konnte. Durch eigene Versuche, die im folgenden beschrieben werden, sollte die Frage geprüft werden, welcher Art die Einwirkung von Rhodamin B auf die Entwicklungsprozesse der Plastiden ist. In Vorversuchen wurde zunächst das Verhalten ergrünender Sprosse von *Helodea densa* bei Kultur in Rhodamin-B-Lösungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden etiolierte Austriebe aus einer achttägigen Dunkelkultur (Länge der Triebe: 1—1,5 cm) in Rhodaminlösungen dem diffusen Tageslicht ausgesetzt. In Konzentrationen von 1 : 100.000 und schwächer konnte keine Vitalfärbung der Knospenblätter erzielt werden. Es wurde deshalb eine Konzentration von 1 : 1000 bzw. 1 : 10.000 angewandt.

Nach 24stündiger Kultur in Lösungen von der Konzentration 1 : 1000 war nur die obere Hälfte älterer Knospenblätter gefärbt. Die mikroskopi-

sche Untersuchung ließ eine schwache Rhodamin-B-Speicherung im primären Granum erkennen. In den meisten Fällen erschienen die Grana unregelmäßig konturiert und befanden sich also noch in den Anfangsstadien ihrer Aufteilung. Vielfach waren Plastiden zu beobachten, deren Granum kleiner als in den Kontrollen und den ungefärbten Blattpartien war und sich vom stark gefärbten Stroma nur sehr schwach abhob. In solchen Plastiden traten im Stroma außerdem 1–4 tröpfchenartige Gebilde auf, die sich durch eine besonders starke Rhodamin-B-Speicherung auszeichneten. In den ungefärbten Teilen des Blattes sowie in den Kontrollen, die in reinem Leitungswasser kultiviert wurden, nahm die Ergrünung ihren normalen Verlauf. Die sekundären Grana wanderten bereits ins Stroma ab.

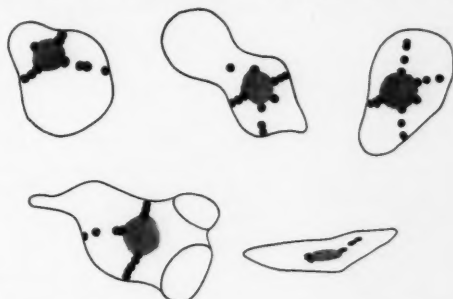


Abb. 9. Abwanderung der ersten sekundären Grana. Beim „Umfallen“ der Geldrollen gleiten die Grana übereinander hinweg ins Stroma.

Nach 2 Tagen waren in den Rhodamin-B-Kulturen deutlich sekundäre Grana am Rande des primären Granums zu erkennen. Die Plastiden waren durchweg vakuolisiert. In den Kontrollen und ungefärbten Blattpartien der Rhodaminversuche war die Ausbildung der Granastruktur vollzogen.

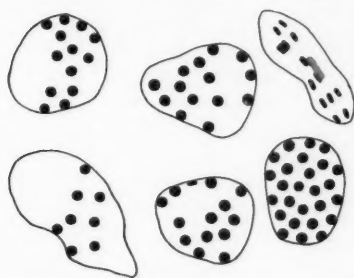


Abb. 10. Verteilung der sekundären Grana im Stroma. Die Grana breiten sich vielfach bevorzugt am Plastidenrand entlang aus.

3 Tage nach Beginn der Belichtung war in den gefärbten Blatthälften eine weitere Aufteilung des primären Granums zu beobachten. Die Plastiden waren abgerundet und hatten ihre Amöboidie verloren.

Etwa nach 5 Tagen begannen die gefärbten Spitzen abzusterben. Kern und Plasma zeigten ebenso wie die Plastiden eine intensivere Färbung. In der zur Blattmitte hin sich anschließenden lebenden Zone waren nur die Plastiden sehr schwach gefärbt. In den Kontrollen und in den ungefärbten Blattregionen verhielten sich die Plastiden normal.

Ähnlich wie in der Konzentration 1 : 1000 verhielten sich die ergrünenden Austriebe in der Konzentration 1 : 10.000. In den nur schwach gefärbten Plastiden kam es aber zu einer völligen Aufteilung des primären Granums. Ein weiterer Fortschritt im Ergrünungsprozeß war dann allerdings nicht mehr festzustellen.

Die Frage nach der Wirkungsweise des Rhodamin B läßt sich entscheiden, wenn die Wellenlängen, die für die photodynamische Wirkung verantwortlich sein können, ausgeschaltet werden. Man kann dies auf einfachste Weise durch Verwendung eines Rhodaminfilters erreichen (vgl. Metzner 1926, Schmidt 1952). Wenn die Rhodamin-B-Wirkung ein photodynamischer Effekt ist, darf nach Ausschaltung des wirksamen Lichtes keine Hemmung des Ergrünungsprozesses eintreten.

Es wurden folgende Versuche angesetzt:

1. Etiolierte Austriebe wurden 4 Stunden in einer Lösung 1:1000 im Dunkeln angefärbt, in Leitungswasser abgespült und in ein Gefäß mit einer Lösung 1:10.000 übertragen. Dieses Gefäß wurde in ein anderes, größeres, das eine Rhodaminlösung 1:1000 enthielt, eingestellt und durch dieses Filter hindurch belichtet.

2. Etiolierte Austriebe wurden 4 Stunden in einer Lösung 1:1000 im Dunkeln angefärbt, abgespült und in ein Gefäß mit einer Lösung 1:10.000 übertragen und dieses in ein Gefäß mit reinem Leitungswasser eingestellt.

3. Etiolierte Austriebe wurden ohne vorhergegangene Anfärbung in einem mit Leitungswasser gefüllten Gefäß in ein anderes, das eine Rhodamin-B-Lösung 1:1000 enthielt, eingestellt. Dieser Versuch war nötig, um zu erkennen, ob nicht die Absorption gewisser Spektralbereiche durch das Rhodaminfilter eine Ergrünungshemmung bewirkt.

4. Zur Kontrolle wurden ungefärbte Austriebe in Leitungswasser ohne Verwendung eines Rhodaminfilters belichtet.

Ergebnis: In den beiden ersten Versuchen stellten sich in den ungefärbten Blattpartien die gleichen Erscheinungen ein, wie sie oben beschrieben wurden: Das primäre Granum wurde mehr oder weniger weitgehend aufgeteilt; es wurde aber in keinem Falle die normale Granastruktur hergestellt. Lediglich in den ungefärbten Blattzonen führte die Belichtung zu einer vollständigen Ergrünung der Plastiden. Die Sprosse der beiden übrigen Versuchsreihen ergrüneten gleich schnell. Die Granastruktur war im Verlauf von 2 Tagen völlig hergestellt.

Die vorstehenden Versuchsergebnisse zeigen, daß die Metamorphose in allen Fällen gehemmt wird, in denen eine Anfärbung des primären Granums erfolgt ist. Diese Hemmung ist auch bei Durchführung einer Lichtfilterung mittels Rhodamin B zu beobachten; sie kann deshalb nicht auf einer photodynamischen Wirkung beruhen. Der Einfluß von Rhodamin B auf den Ergrünungsvorgang muß aus diesem Grunde als eine Giftwirkung angesehen werden.

V. Degeneration etiolierter Plastiden

Offensichtlich auf Grund des Hungerzustandes erleiden die etiolierten Plastiden bei genügend langer Dunkelkultur (6–8 Wochen) eine starke Degeneration, deren Symptome sich wie folgt beschreiben lassen:

Entnimmt man einem Sproß aus einer etwa 8 Wochen alten Dunkelkultur ein Blatt aus der basalen Knospenregion, so trifft man in der unteren Blatthälfte zunächst auf Bilder, wie sie für die Normalfälle etiolierter

Plastiden beschrieben wurden. Beim Fortschreiten zur Blattspitze hin bemerkt man einen Abbau der Stärke. Gleichzeitig ist ein Rückgang der amöboiden Formveränderlichkeit des Stromas zu beobachten. Das primäre Granum erscheint in Profilsicht vielfach dick oval, gelegentlich ist es nahezu kugelig. Sein Durchmesser beträgt bis zu $2,5-3 \mu$. Weiter zur Spitze hin kann man die Feststellung machen, daß sich das primäre Granum in sekundäre Grana aufteilt. Diese Grana sind zunächst scheibenförmig und haben eine Größe von etwa $0,3-0,4 \mu$. Sie sind ebenso wie das primäre Granum gelb pigmentiert. Vergleiche im Fluoreszenzmikroskop zeigen, daß alle Grana völlig chlorophyllfrei sind.

In älteren Blättern, die aus Wirteln unterhalb der Blattknospe stammen, sieht man, daß die sekundären Grana kugelige Gestalt angenommen haben. Die Tröpfchen bleiben in einem mehr oder weniger dichten Haufen im Bereich des früheren primären Granums liegen. Nur einige verteilen sich im Stroma. Zur Blattspitze hin werden die Tropfen an Zahl geringer, im Durchmesser aber größer. Man darf deshalb wohl auf eine Vereinigung zu größeren Tropfen schließen. In den am weitesten fortgeschrittenen Stadien der Degeneration ist das Stroma stärkstens reduziert und entzieht sich in vielen Fällen der mikroskopischen Sichtbarkeit. Die Blätter, die eine derartige Plastidenreduktion erfahren haben, können noch wochenlang am Leben bleiben. Es zeigt sich dann häufig eine verstärkte Plasmaströmung.

Die an den etiolierten Plastiden auftretenden Degenerationserscheinungen entsprechen völlig dem herbstlichen oder durch Verdunkelung bewirkten Vergilben normaler Chloroplasten. Auch hier bestehen die Veränderungen in einer Stromareduktion und einer Entmischung zu großen, durch die Carotinoide gelb gefärbten Tropfen bei gleichzeitigem Chlorophyllabbau (vgl. Küster 1952). Ähnliche Schwunderscheinungen haben Klebs (1888) und Lärz (1942) bei der Einwirkung von Chromaten auf *Funaria*- und *Helodea*-Blätter beobachtet.

VI. Besprechung der Ergebnisse

Aus den vorliegenden Beobachtungen geht deutlich hervor, daß zwischen den Proplastiden und den etiolierten Plastiden von *Helodea densa* eine grundsätzliche Übereinstimmung besteht. Beide Plastidenformen besitzen einen amöboid beweglichen Stromaleib, in den ein primäres Granum eingelagert ist. Bei Dunkelkultur werden offensichtlich die Differenzierungsvorgänge in den Chloroplastenanlagen gehemmt, während die Fähigkeit zum Plasmawachstum erhalten bleibt. Die etiolierten Plastiden sind deshalb als vergrößerte Proplastiden aufzufassen.

Entgegen den Befunden von Heitz und Maly wurden durch die eigenen Vitaluntersuchungen die von Strugger mitgeteilten Beobachtungen über die Kontinuität der Grana bestätigt. In lebenden Präparaten ist das primäre Granum der Proplastiden sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzmikroskop nur schwer aufzufinden. Wesentlich ist, daß zuweilen auch homogen fluoreszierende Proplastiden im vergleichenden Hellfeldbild ein primäres Granum erkennen lassen. Diese Feststellung wird durch Beob-

achtungen, die an vergleichsweise herangezogenen fixierten und gefärbten Präparaten durchgeführt wurden, unterstützt. Nach sorgfältiger Anfärbung kann in allen Proplastiden ein primäres Granum nachgewiesen werden. Auf Grund dieser vergleichenden Beobachtungen läßt sich die sichere Aussage machen, daß das primäre Granum ein präexistierender Bestandteil der Proplastiden ist. Das von Heitz und Maly aufgeworfene Problem kann sich daher nur auf die Frage nach dem Entstehungsort des Chlorophylls in ergrünenden Proplastiden beziehen. — Es war mir nicht möglich, mit Hilfe der mir zur Verfügung stehenden optischen Ausrüstung zu entscheiden, wo das Chlorophyll zuerst auftritt. Es bedarf noch intensiver Untersuchungen mit bester apparativer Ausrüstung, um eine sichere Entscheidung dieser Frage herbeiführen zu können. — In den etiolierten Plastiden ist das primäre Granum auch intravital mit Sicherheit zu erkennen. An diesen läßt sich eindeutig beobachten, daß das erste Auftreten des Chlorophylls an das primäre Granum gebunden ist.

Durch die Lebendbeobachtungen über die Teilungsfähigkeit des primären Granums werden auch die letzten Zweifel an seiner Kontinuität ausgeschlossen. Das Teilungsvermögen wurde sowohl im Zuge der Proplastidenvermehrung als auch im Verlaufe des Ergrünungsprozesses junger und alter etiolierter Zellen belegt. Durch Vitaluntersuchungen an sich teilenden Proplastiden wurden die von Strügger an fixiertem Material von *Agapanthus umbellatus* beschriebenen Bilder voll bestätigt.

Die Metamorphose vom monogranulären zum polygranulären Plastid verläuft in den Proplastiden der postmeristematischen Blattzone und in den etiolierten Plastiden der Dauerzone unterschiedlich. Im Proplastid erfährt das primäre Granum, das mit $0,3\text{--}0,6\ \mu$ Durchmesser ebenso groß ist wie die sekundären Grana, eine flächenhafte Teilung. Die Granateilung selbst wurde bei der Ausbildung der polygranulären Chloroplastenstruktur nicht beobachtet. Dagegen wurden in den ersten Ergrünungsstadien Reihen von übereinanderliegenden Grana angetroffen. Diese lassen den berechtigten Schluß zu, daß die sekundären Grana durch flächenhafte Teilungen aus dem primären Granum hervorgegangen sind. Die Grana dieser ersten Geldrollen breiten sich alsbald im Stroma aus und bilden horizontale Grana-schichten, von denen aus weitere Geldrollen entwickelt werden.

Bei den etiolierten Plastiden der Dauerzone ist der Modus des Ergrünens ein anderer. Das primäre Granum ist infolge der Dunkelkultur in der Fläche und in der Dicke stark gewachsen; sein Durchmesser beträgt etwa $1,2\text{--}1,6\ \mu$. Dieses Wachstum läßt sich durch eine Vermehrung und flächenhafte Vergrößerung der Elementarlamellen erklären, wodurch ein mächtiges Lamellenpaket entsteht. Durch polarisationsoptische Untersuchungen wurde diese Annahme erhärtet. In der Dauerzone der unteren Blattoberfläche etiolierter Blätter konnte in der Tat eine Doppelbrechung des primären Granums gesehen werden (über diese Beobachtungen wird in einer späteren Mitteilung berichtet werden). Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die Weber (1936) an normalen Chloroplasten erhalten hat und durch die der lamellare Aufbau der sekundären Grana polarisationsmikroskopisch belegt wurde.

Die Beobachtungen über die Bildung der sekundären Grana aus dem primären Granum etiolierter Plastiden zeigen übereinstimmend, daß die Bildung der Sekundärgrana immer vom Rande des Primärgranums aus zur Mitte fortschreitet. Wichtig ist fernerhin, daß in der Mehrzahl der Fälle die Grana der zuerst gebildeten Geldrollen bei der flächenhaften Ausbreitung im Stroma gerichtet aus ihren Verbänden ausscheren. Diese Beobachtungen lassen folgende hypothetische Deutungen zu:

1. Es ist möglich, daß das primäre Granum sich in reduplikable Bereiche von der Größe der sekundären Grana aufteilt. Durch identische Reproduktionen kommt es dann zur Bildung von ersten Geldrollen, welche alsbald umkippen und eine flächenhafte Ausbreitung der Grana bewirken.

2. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist durch zwei Arbeiten gegeben, die in jüngster Zeit erschienen sind. Leyon und v. Wettstein (1954) und v. Wettstein (1954) haben gezeigt, daß die Phaeophyceen-Chromatophoren durchgehend lamelliert sind. Es entspricht somit der strukturelle Aufbau eines solchen Chromatophors demjenigen eines einzelnen Granums in den Chloroplasten der Cormophyten. Es ist deshalb denkbar, daß die Teilungsvorgänge an den stark vergrößerten primären Grana etiolierter Plastiden in ähnlicher Weise verlaufen, wie sie v. Wettstein an *Fucus*-Chromatophoren beschrieben hat. Man könnte dann annehmen, daß durch lokales Wachstum und Einschnürung zunächst Proliferationen entstehen, aus denen später durch völlige Trennung die sekundären Grana hervorgehen.

Zusammenfassung

1. Im Bau der Proplastiden und der etiolierten Plastiden von *Helodea densa* wird eine prinzipielle Übereinstimmung festgestellt. Beide Plastidenformen besitzen einen amöboiden Stromaleib, in den ein primäres Granum eingelagert ist.

2. Im Sinne Struggers und im Gegensatz zu Heitz und Maly wird festgestellt, daß das primäre Granum ein kontinuierliches Strukturelement der Proplastiden ist.

3. Die Befunde Struggers über den Vorgang der Granateilung konnten durch Vitalbeobachtungen voll bestätigt werden.

4. Bei der Ergrünung der Proplastiden und der etiolierten Plastiden entstehen die sekundären Grana stets aus der Substanz des primären Granums.

5. Der Ort der ersten Pigmentbildung bleibt kontrovers. Das Chlorophyll kann in den ersten Ergrünungsstadien vorübergehend auch im Stroma zuerst auftreten.

6. Es wird die Herstellung der Granastruktur in den ergrünenden Plastiden soweit wie möglich beschrieben.

7. Die Vitalfärbung ergrünender Triebe mit Rhodamin B ruft eine Hemmung der Metamorphose hervor. Es wird gezeigt, daß diese Hemmung auf einer Giftwirkung beruht und nicht photodynamischer Natur ist.

8. Bei langandauernder Dunkelkultur erleiden die etiolierten Plastiden eine Degeneration. Die Symptome dieser Degeneration werden im einzelnen beschrieben.

Literatur

- Baur, E., 1950: Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. 7.—11. Aufl. Berlin.
- Heitz, E., und R. Maly, 1955: Zur Frage der Herkunft der Grana. Zeitschr. f. Naturf. 8b, 245.
- Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 67, 95.
- Klebs, G., 1888: Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. Unters. bot. Inst. Tübingen 2, 489.
- Küster, E., 1952: Die Pflanzenzelle. Fischer, Jena.
- Lärz, H., 1942: Beiträge zur Pathologie der Chloroplasten. Flora 155, 319.
- Leyon, H., und D. v. Wettstein, 1954: Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen. Ztschr. f. Naturf. 9b, 471.
- Pirson, A., und F. Alberts, 1940: Über die Assimilation von *Helodea*-Blättchen nach Vitalfärbung mit Rhodamin B. Protoplasma 35, 151.
- Reinhard, H., 1955: Über die Teilung der Chloroplasten. Protoplasma 19, 541.
- Renner, O., 1954: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. math.-phys. Kl. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig 86, 241.
- Schimper, A. F. W., 1885: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Bot. Ztg. 41, 105.
- Schmidt, H. H., 1952: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten II. Protoplasma 40, 507.
- Strugger, S., 1957a: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. Flora 151, 115.
- 1957b: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. Flora 151, 524.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturw. 37, 166.
- 1955: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 66, 459.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Protoplasma 45, 120.
- 1954: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des primären Granums in den Proplastiden. Naturw. 41, 286.
- Weber, F., 1956: Doppelbrechung und Grana der Chloroplasten. Mikrochemie, „Molisch-Festschrift“, 447.
- Wettstein, D. v., 1954: Formwechsel und Teilung der Chromatophoren von *Fucus vesiculosus*. Ztschr. f. Naturf. 9b, 476.
- Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, danke ich für die Überlassung des Themas und das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange

Von

Helmut Kinzel

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 17. Jänner 1955)

Einleitung

Der von Strugger (1940) in die botanische Vitalfärbetechnik eingeführte Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange hat sich als außerordentlich brauchbar erwiesen. Besonders eine charakteristische Eigenschaft dieses Farbstoffes, nämlich in Form seiner Einzelionen und in vielen chemischen Verbindungen grün zu fluoreszieren, in konzentrierten Lösungen und bei manchen Adsorptionerscheinungen hingegen rot leuchtende Assoziate zu geben, hat uns einerseits eine Fülle bisher unbekannter Erscheinungen erschlossen, anderseits dazu geholfen, manche bereits bekannte Phänomene mit vereinfachter und verfeinerter Methodik zu studieren.

Einen bedeutenden Gewinn an Erkenntnissen brachten uns unter anderem jene Versuche, die sich mit der Färbung der pflanzlichen Zellwand beschäftigten. Seit den Untersuchungen von Strugger (1936) und vor allem von Drawert (1937) mit Hellfeldfarbstoffen war bekannt, daß die Anfärbung der Membranen vom pH-Wert der verwendeten Farblösung abhängt. Verwendet man pH-gestufte Farblösungsreihen, dann ist zumeist um pH 3 eine deutliche Färbeschwelle zu beobachten. Unterhalb von pH 3 nehmen die Membranen vieler Gewebe keinen Farbstoff auf, oberhalb von pH 3 erscheinen sie gefärbt. Als Strugger (1940) nun analoge Versuchsreihen mit Akridinorange anstellte, sah er, daß oberhalb von pH 3 — wie erwartet — die Zellwände gefärbt waren und rote Fluoreszenz zeigten, daß aber überraschenderweise auch unterhalb von pH 3 etwas Farbstoff aufgenommen wurde. Die Färbung war zwar im Hellfeld unsichtbar, zeigte sich aber im UV-Licht als ein, wenn auch schwaches, so doch deutliches grünes Leuchten. Die Schwelle selbst, die also hier nicht als Auftreten einer Färbung, sondern als Wechsel in der Fluoreszenzfarbe in Erscheinung trat, hatte im übrigen die gleiche Lage wie bei der Untersuchung mit Hellfeldfarbstoffen.

Diese Färbeschwelle nannte man, in Anlehnung an ein ähnliches Verhalten der Eiweißstoffe, den isoelektrischen Punkt (IEP) der Zellwand. Höfler (1946) schlug den Namen „Entladungspunkt“ (EP) vor, da es ja im allgemeinen nicht zu einer Umladung der Membranen kommt. Als Ursache dieser Färbeschwelle nahm man allgemein an, daß die Zellulose geringe Mengen von Carboxylgruppen enthält, die im dissoziierten Zustande der Membran eine negative Ladung verleihen, die sie zur Speicherung basischer Farbstoffe befähigt, während im allzu sauren Bereich die Dissoziation der in der Zellwand enthaltenen COOH-Gruppen zurückgedrängt wird, was mit einem Verlust der negativen Ladung und der Adsorptionsfähigkeit verbunden ist.

Eine in dieser Zeitschrift erschienene Arbeit (Kinzel 1953 b) brachte hier einige neue Erkenntnisse. Einerseits zeigt es sich, daß bei Membranen, die auf chemischem Wege von Pektinstoffen befreit worden waren, die Rotfluoreszenz entweder ganz ausbleibt oder zumindest die Färbeschwelle (der EP) stark nach dem Neutralpunkt hin verschoben ist. Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß die Carboxylgruppen, die den Farbstoff auf elektroadsorptivem Wege festhalten, nicht der Zellulose, sondern den Pektinstoffen angehören, die ja in den Zellwänden lebender, saftiger Gewebe stets enthalten sind¹.

Als methodische Neuerung ergab sich ferner, daß für die Messung des EP von Membranen anstatt der pH-Reihen auch solche Farblösungsreihen verwendet werden können, die steigende Mengen eines Neutralsalzes — am günstigsten ist CaCl_2 — enthalten. Dabei entsprechen dann die Lösungen mit hohem CaCl_2 -Gehalt den stark sauren, die Lösungen mit geringerem CaCl_2 -Gehalt den schwächer sauren bzw. neutralen pH-Stufen. Der Vorteil dieser Art von Lösungsreihen besteht neben ihrer leichteren Herstellbarkeit vor allem darin, daß die Lösungen mit hohem Salzgehalt von lebenden Zellen bedeutend besser vertragen werden als die stark sauren Lösungen. Für Färbungen des Zellinhaltes jedoch, bei denen es auf den Dissoziationszustand des Farbstoffes ankommt, sind solche Lösungsreihen den pH-Reihen natürlich nicht äquivalent.

Die Arbeit vom Jahre 1953 enthält auch Versuche mit Zellwänden, die mit Kupferoxydammoniak (Cuoxam) behandelt worden waren. Membranen, die mit diesem Reagens, das Watte augenblicklich löst, mehrere Tage lang behandelt worden waren, wurden als von der Hauptmenge der Zellu-

¹ Verholzte oder sonstwie inkrustierte Zellwände werden jedoch weder in der eben zitierten noch in der vorliegenden Arbeit in den Kreis der Betrachtungen gezogen.

Schwarz (1924) hat für Zellwände, die in der Hauptsache aus Zellulose, Hemizellulose und Pektinstoffen bestehen, also z. B. die Wände von Kambiumzellen, unverholzten Parenchymzellen und Bastfasern, Kollenchymzellen und Reservezellulosezellen, den Ausdruck „Zellinwände“ vorgeschlagen und ihm die Ausdrücke „Ligninwände“ und „Kutinwände“ gegenübergestellt. Es wäre empfehlenswert, diesen sehr praktischen und gut definierten Ausdruck, den seinerzeit schon Czaja (1950, 1954) übernommen hatte, wieder in Gebrauch zu nehmen, wie dies in der vorliegenden Arbeit geschehen soll.

lose befreit betrachtet. In der Folge zeigte es sich jedoch, daß die Entfernung der Zellulose oft nicht vollständig gewesen war. Offenbar macht die Trennung der wohl z. T. ineinander verfilzten Zellulose- und Pektin-Makromoleküle große Schwierigkeiten. Zur vollständigen Entfernung der Zellulose kann bei gewissen Objekten eine mehrere Monate lange Behandlung mit Cuoxam nötig werden. Von dieser Tatsache wird das Hauptergebnis der Arbeit von 1953, nämlich die Zuordnung der Rotfluoreszenz zu den in den Pektinstoffen enthaltenen Carboxylgruppen, nicht beeinflusst. Die Versuche mit zellulosefreien Membranen blieben jedoch zu wiederholen. Sie bilden, vermehrt um einige weitere Experimente, den Inhalt der vorliegenden Arbeit, die sich vor allem mit dem Wesen der grünen und gelben Fluoreszenz akridinorangegefärbter Membranen beschäftigt.

Versuche

A. Die zeitliche Verfolgung der Cuoxam-Einwirkung

Versuch 1

Sonnenblumenmark (*Helianthus annuus*, Stengelmark) wurde 50 bis 90 μ dick geschnitten und in frisch bereitetes Cuoxam (Kupferoxyd-ammoniak) eingelegt. Nach 3 Tagen wurden einige Schnitte entnommen, gewässert, mit verdünnter Essigsäure behandelt und wieder gewässert. Wurde nun zu einem solchen Schnitt Chlorzinkjod zugesetzt, dann trat äußerst rasch (nach etwa 2 Sekunden) eine kräftige Violettfärbung mit einem Stich ins Bräunliche auf, während ein nicht mit Cuoxam vorbehandelter Schnitt 10 bis 20 Sekunden und länger braucht, um die gleiche Farbtiefe zu erreichen. Der Farbton ist dabei mehr blauviolett. (Wahrscheinlich wird die Zellulose durch die Vorquellung in Cuoxam aufgelockert, so daß die Chlorzinkjod-Reaktion rascher eintritt.)

Nach 4 Tagen entnommene und ebenso behandelte Schnitte verhielten sich gleichartig.

Ein nach 6 Tagen entnommener Schnitt färbte sich ebenfalls rasch und deutlich violett. Nur am Rande des Schnittes blieben einige Zellwände farblos oder färbten sich in einem bräunlichen Tone an. Die Violettfärbung war nach wie vor dichroitisch.

Ein weiterer, 6 Tage lang mit Cuoxam behandelter Sonnenblumenmarkschnitt wurde in verdünnter HCl eine Minute lang gekocht und nach dem Wässern unter dem Mikroskop mit NH_3 behandelt. Diese Behandlungsweise wird in der Literatur zum Herauslösen von Pektinstoffen empfohlen. Der größte Teil der Zellwandsubstanz löste sich denn auch im Ammoniak glatt auf, und es entstand der Eindruck, als seien die Zellwände überhaupt verschwunden. Erst bei ganz zugezogener Blende sah man, daß sie doch noch, und zwar in Form von ganz zarten Häuten, vorhanden waren. Diese Häute zeigten deutliche Doppelbrechung und gaben mit Chlorzinkjod eine kräftige Violettfärbung, die merklich dichroitisch war. Sie waren aber, obwohl sie also offensichtlich aus Zellulose bestanden, in Cuoxam innerhalb einiger Minuten nicht löslich.

Dagegen vernichtete in einem gleichfalls 6 Tage lang mit Cuoxam behandelten Schnitt 70prozentige Schwefelsäure im Laufe von 15 Minuten die Doppelbrechung nahezu vollkommen, löste also offenbar die Zellulose praktisch vollständig heraus, allerdings litten die Schnitte unter dieser Behandlung stark: Sie hielten eine nachträgliche Behandlung mit Chlorzinkjod nicht aus, sondern zerfielen darin.

21 Tage lang mit Cuoxam vorbehandelte Sonnenblumenmarkschnitte gaben mit Chlorzinkjod deutliche Violettfärbung, aber nicht so dunkel und ausgeprägt wie unvorbehandelte Schnitte und mit einem bräunlichen Unterton. Die Reaktion trat aber nach wie vor bedeutend rascher ein als an unbehandelten Schnitten. Das verwendete Cuoxam löste auch jetzt noch Watte innerhalb kürzester Zeit auf.

Nach 31 Tagen Cuoxam-Behandlung war die Doppelbrechung schwach, mit Chlorzinkjod trat aber immer noch vielfach violette, schwach dichroitische, stellenweise aber auch bräunliche Färbung auf.

Eine weitere Portion von Sonnenblumenmarkschnitten wurde in frisches Cuoxam eingelegt und erst nach 4 Monaten entnommen. Sie hatten nun kupferhaltige Niederschläge eingelagert und waren sehr zerbrechlich. Erst nach einer eintägigen Behandlung mit verdünnter Essigsäure waren sie farblos. Leider befand sich in vielen Zellen ein körnig-flockiger Niederschlag, der wohl aus Zellulose bestand, die beim Übertragen von Cuoxam in Wasser ausgefällt worden war. Die ursprünglichen Zellwände waren jedoch trotzdem zumeist gut erkennbar. Diese waren nun wirklich zellulosefrei. Während der in den Zell-Lumina befindliche Niederschlag mit Chlorzinkjod sich schön violett färbte, zeigte die ursprüngliche Zellwand keine Spur einer solchen Färbung und löste sich in konzentriertem Ammoniak. (Pektinstoffe werden ja durch eine Säure-Vorbehandlung in Alkalien löslich gemacht.)

Orientierende Versuche an anderen Objekten gaben ähnliche Resultate. Die Befreiung von Zellulose dauerte allerdings bei diesen nicht so lange wie beim Sonnenblumenmark, das offenbar eine besonders hochmolekulare und dichtgepackte Zellulose enthält. So gaben Querschnitte durch den Stengel von *Petasites vulgaris* nach 2 Tagen Cuoxam-Behandlung noch intensive Zellulosereaktion mit Chlorzinkjod, ebensolche von *Pelargonium* nach 8 Tagen noch blaßviolette Färbung. Dagegen waren Schnitte durch den weißen Teil von Orangenschalen zum Teil schon nach 3 Tagen weitgehend zellulosefrei, Zwiebelhäutchen von *Allium cepa* nach etwa 5 Tagen.

Beim Versetzen der mit Cuoxam behandelten Schnitte mit Chlorzinkjod fiel mir auf, daß an den Zellwänden kleine, längliche, blaßgelbe Kristalle auftraten. Da sich nun zweiwertige Kupfersalze mit Jodiden in einer sehr empfindlichen Reaktion nach folgender Gleichung umsetzen: $2\text{CuSO}_4 + 4\text{KJ} = \text{Cu}_2\text{J}_2 + 2\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{J}_2$, so nahm ich an, daß das im Chlorzinkjod enthaltene Jodid mit Kupferspuren, die offenbar auch nach der Behandlung mit Essigsäure noch in der Membran zurückbleiben, in der genannten Weise reagiert, wobei die beschriebenen Kristalle gebildet werden. Ich setzte, um diese Reste von Kupfer aus den Zellwänden zu entfernen, der zum Auswaschen verwendeten Essigsäure etwa 1 Mol CaCl_2 zu. Dieses wirkt ja gegenüber elektroadsorptiv gebundenen Ionen kräftig adsorptionsverdrängend (Höfler und Stiegler 1947) und hatte hier auch tatsächlich den Erfolg, daß die störende Bildung von Kristallen ausblieb. Vielleicht läßt sich die beschriebene

Reaktion, die auch in mikroskopischen Dimensionen recht empfindlich zu sein scheint, bei Bedarf zu einer mikrochemischen Nachweismethode für Kupfer ausbauen.

Nachdem nun auf diese Weise festgestellt worden war, wie lange das Cuoxam zur Entfernung der Zellulose einwirken muß, konnten die Hauptversuche zur Fluorochromierung zellulosefreier Schnitte in Angriff genommen werden.

B. Fluorochromierung zellulosefreier Objekte mit Akridinorange

Versuch 2

Orangenschalen (Alkoholmaterial) wurden 120μ dick geschnitten (dünnere Schnitte vertragen die Cuoxam-Behandlung schlecht) und 8 Tage lang in Cuoxam eingelegt. Dann wurde mit Wasser bzw. verdünnter, CaCl_2 -haltiger Essigsäure gewaschen. Je ein Schnitt wurde nun in eine Stufe einer Akridinorange- CaCl_2 -Reihe (vgl. Kinzel 1953 b, S. 217) eingebracht. Die Lösungen enthielten Akridinorange in der Konzentration 1 : 10 000 und fallende Mengen von CaCl_2 . Die in der ersten Spalte der Tabelle enthaltenen Ziffern geben die in der betreffenden Lösung enthaltene CaCl_2 -Konzentration in Mol an. Die Färbezeit wurde meist ziemlich reichlich bemessen (etwa eine halbe bis eine Stunde). Es handelt sich ja um die Einstellung eines Adsorptionsgleichgewichtes am Objekt, dessen Lage sich, wenn es sich einmal eingestellt hat, nicht mehr verändert. Es ist auch wichtig, das Objekt in eine genügende Menge Farblösung zu bringen, so daß es sich wirklich mit Farbstoff sättigen kann. Eine Färbung zwischen Objektträger und Deckglas ist nicht empfehlenswert.

CaCl_2 -Konzentration	Fluoreszenz des Parenchyms der Schnitte	
	Mit Cuoxam behandelt	Kontrolle (unbehandelt)
0,18	unsichtbar	bräunlichgrün
0,1	unsichtbar	bräunlichgrün
0,056	unsichtbar	bräunlich
0,052	ganz stumpf rötlich	bräunlich
0,018	karminrot	stumpf ziegelrot
0,01	karminrot	ziegelrot
0,0056	stärker karminrot	ziegelrot bis karminrot
0,0052	stärker karminrot	ziegelrot bis karminrot

Die zellulosefreien Schnitte sind in den Farblösungen mit hohem CaCl_2 -Gehalt oft so völlig fluoreszenzfrei, daß sie im UV-Licht überhaupt nicht zu finden sind.

An ähnlich, nur längere Zeit hindurch mit Cuoxam vorbehandelten Schnitten wurden auch Entfärbungsversuche durchgeführt. Behandelt man solche Schnitte 15 Minuten lang mit einer reinen, CaCl_2 -freien Akridin-

orangefärbung der Konzentration 1:1000, dann erscheinen sie makroskopisch orangegelb gefärbt und fluoreszieren dunkel karminrot. Wird nun eine 0,2 molare CaCl_2 -Lösung durch das Präparat gesaugt, dann entweicht der Farbstoff in Form einer rot aufleuchtenden Wolke und es bleibt in den Zellwänden nicht die geringste Spur einer Grünfluoreszenz zurück.

Erwähnen möchte ich noch folgende Beobachtung: Die verholzten Teile der Schnitte fluoreszieren ohne Cuoxam-Vorbehandlung in den stark CaCl_2 -haltigen Farblösungen orangegelb, in den schwach CaCl_2 -haltigen zitronengelb (vgl. Kinzel 1953 b, Versuch 8). Nach Vorbehandlung in Cuoxam ist die Fluoreszenz in den stark CaCl_2 -haltigen Akridinorangefärbungen kräftig rotbraun, in den schwach CaCl_2 -haltigen wie zuvor zitronengelb. Zwischen diesen beiden Extremfarben treten innerhalb der CaCl_2 -Reihe alle Übergänge auf. Eine kausale Deutung dieser Fluoreszenzfarben ist noch nicht möglich.

Versuch 5

Schnitte durch Sonnenblumenmark (*Helianthus annuus*, Stengelmark, etwa $90\ \mu$ dick) wurden 5 Monate lang in Cuoxam aufbewahrt. Dann wurde in Wasser und verdünnter Essigsäure gewaschen. Die Schnitte gaben nun keine deutliche Chlorzinkjodreaktion mehr.

Nach Behandlung mit der Akridinorange- CaCl_2 -Reihe ergab sich folgendes Bild:

CaCl_2 -Konzentration	Fluoreszenz der Zellwände	Farbe der Zellwände im Hellfeld	Makroskopisches Aussehen der Schnitte
0,056	unsichtbar	farblos	farblos
0,052	unsichtbar	farblos	farblos
0,018	unsichtbar	farblos	farblos
0,01	deutlich bis eben noch wahrnehmbar, ganz dunkel karminrot	hellgelb bis fast farblos	ganz zart orange
0,0056	dunkel karminrot	kräftig gelb	orangegelb
0,0032	dunkel karminrot	kräftig gelb	orangegelb

Unverholzte Zellwände, die Akridinorange bis zu einer (im Hellfeld) kräftigen Gelbfärbung gespeichert haben, fluoreszieren normalerweise in einem hellen, kräftigen Rot (Strügger 1940 spricht von einer intensiv kupferroten, gleißenden Fluoreszenz). Zellulosefreie Schnitte dagegen, die im Hellfeld ebenfalls kräftig gelb erscheinen (z. B. in schwach salzhaltigen oder reinen Akridinorangefärbungen), leuchten im UV-Licht nur in einem sehr schönen, tiefen, aber dunklen Karminrot. Saugt man nun durch das Präparat 0,2 molare CaCl_2 -Lösung, dann entweicht der Farbstoff in einer Wolke, deren Rot heller ist als vorher der Gesamteindruck des gefärbten Schnittes. Es ist manchmal ein frappierendes Bild, wenn aus dem dunkel karminrot leuchtenden Schnitt beim Zusatz der Salzlösung eine hellrot leuchtende Wolke entweicht und nicht die geringste Spur der sonst gewohnten Grünfluoreszenz zurückbleibt.

Versuch 4

Zwiebelhäutchen (*Allium cepa*, Innenepidermis) wurden 7 Tage lang mit Cuoxam behandelt und mit Wasser und CaCl_2 -haltiger, verdünnter Essigsäure gewaschen. Die so erhaltenen Objekte waren sehr zart und hin-fällig. Bei zu langer Einwirkung von Cuoxam blieb von jedem Häutchen nur die Cuticula übrig. Mit Chlorzinkjod gaben die erhalten gebliebenen Zellwände immer noch eine, wenn auch sehr schwache Violettfärbung. Da-gegen waren innerhalb der Zellen, wahrscheinlich beim Übertragen von Cuoxam in Wasser, die Gilsonschen Zellulosekristalle ausgefallen, die sich mit dem Chlorzinkjod tief violett färbten. Solche Epidermishäutchen wur-den nun mit den CaCl_2 -gestuften Akridinorangelösungen behandelt.

CaCl ₂ -Kon- zentration	Fluoreszenz	
	der Zellwände	der Zellulosekristalle
0,1	unsichtbar	grün
0,056	unsichtbar	grün
0,032	ganz dunkel rötlich	grün
0,018	stumpf ziegelrot	grün
0,01	ziegelrot	grün
0,0056	kräftig rot	

Versuch 5

Petasites communis, junger Blattstiel, quer, 120 μ dick (vgl. Kinzel 1953 b, Versuch 8). Die Schnitte wurden 3 Tage lang mit Cuoxam behan-delt, mit Wasser und CaCl_2 -haltiger Essigsäure gewaschen. Es blieben im wesentlichen nur die Kollenchymringe übrig. Die Behandlung mit den Akridinorange- CaCl_2 -Reihen ergab folgendes:

CaCl ₂ -Konzentration	Fluoreszenz der Kollenchym-Zellwände
0,1	praktisch unsichtbar
0,056	an dickeren Stellen rötlicher Schimmer
0,032	stellenweise rötlicher Schimmer
0,0052	kräftig rot

Als weitere Objekte zog ich die Gallertbildungen von Algen heran, die an unserem Institut durch einige in jüngster Zeit durchgeführte Unter-suchungen wohlbekannt waren (vgl. Höfler u. Schindler 1952, Kinzel 1953 a). Sie sind für das Thema der vorliegenden Arbeit deshalb bedeutsam, weil sie aus Kohlehydraten bestehen, die mit basischen Farb-stoffen färbbar sind, aber schon im natürlichen Zustand keine Zellulose enthalten und also nicht erst durch einen bei aller Vorsicht doch immerhin recht drastischen chemischen Eingriff davon befreit werden müssen. Ich

wählte die in vielen Färbversuchen bewährte, breite Gallerthülle von *Hyalotheca dissiliens* (Abb. 1).

Versuch 6

Hyalotheca dissiliens wurde mit einigen Stufen der Acridinorange- CaCl_2 -Reihe behandelt. Die Fluoreszenz der Zellwand ist wegen der roten Eigenfluoreszenz der Chloroplasten schlecht sichtbar und wurde daher



Abb. 1. *Hyalotheca dissiliens*. Färbung der Gallerthülle mit Methylenblau. (Aus Kinzel 1953 a, Abb. 1.)

z. T. mit ? versehen. Entscheidend war vor allem das Verhalten des Objektes in der am stärksten salzhaltigen Stufe. Daher wurde an dieser Stelle eine Lösung verwendet, die außer Akridinorange in der Konzentration 1 : 10 000 und 0,18 mol CaCl_2 noch 1 mol Traubenzucker enthielt. Neben den plasmolysierten Protoplasten war nun auch die schwache grüne Fluoreszenz der Zellwände gut zu sehen.

CaCl ₂ -Konzentration	Fluoreszenz	
	der Gallerthülle	der Zellwände
0,18 + Trz.	unsichtbar	zart grün
0,01	ganz zart rötlich	rot ?
0,0032	kräftig rot, z. T. kontrahiert	rot ?

In allen bisher unter B mitgeteilten Versuchen tritt eine Erscheinung immer wieder auf: Zellulosefreie Objekte geben mit Akridinorange keine Grünfluoreszenz. Dabei ist es gleichgültig, ob man Zellwände betrachtet, denen die Zellulose durch Behandlung mit Cuoxam entzogen wurde, oder eine Algengallerte, die von Natur aus keine Zellulose enthält. Es tritt zwar in den schwach salzhaltigen Lösungen Rotfluoreszenz auf, treibt man aber den elektroadsorptiv gebundenen Farbstoff durch stärkeren Salzzusatz aus, dann bleibt keine Grünfluoreszenz zurück. — Ein weiterer Versuch zeigt aber, daß die Gegenüberstellung:

Zellulosehaltige Objekte geben Grünfluoreszenz, zellulosefreie nicht — zu eng gefaßt wäre. Nicht allein Zellulose kann Akridinorange zur Grünfluoreszenz speichern.

Versuch 7

Stärkekekörner von *Solanum tuberosum* (käuferliche Kartoffelstärke) wurden in der Akridinorange- CaCl_2 -Reihe gefärbt.

CaCl ₂ -Konzentration	Fluoreszenz der Stärkekekörner
0,18	grün
0,1	grün
0,056	grün
0,032	grün
0,018	grün
0,01	grün
0,0056	grün, z. T. mit Stich ins Gelbliche
0,0032	die größeren Körner meist noch grün, die kleineren zeigen alle Übergänge zu ocker-gelb, z. T. fast orange-gelb

Dieses Ergebnis zeigt, daß auch ein zellulosefreies Objekt Akridinorange zur Grünfluoreszenz speichern kann. Es ist also festzuhalten, daß Zellulose und Stärke und nach den Versuchen von Höfler und Peck-sieder (1947) auch Chitin den Farbstoff mit grüner Fluoreszenz aufzunehmen vermögen, Pektin und *Hyalotheca*-Gallerte nicht. Es lassen sich aber noch andere Gemeinsamkeiten zwischen den Vertretern dieser beiden Stoffgruppen aufzeigen: Die drei erstgenannten Stoffe sind doppelbrechend, die beiden letztgenannten nicht. Ferner haben Zellulose und Stärke bekanntlich die Eigenschaft, unter bestimmten Umständen mit Jodreagenzien violette bzw. blaue Färbungen zu geben, Pektin und die Gallertsubstanz nicht. Die theoretische Auswertung dieser auffälligen Korrelation soll erst im letzten Abschnitt versucht werden. Hier sei nur noch erwähnt, daß auch eine Suspension von gefällter Zellulose sich ähnlich verhält wie native Zellulose: Fällt man Zellulose aus einer Lösung in Cuoxam durch Zusatz von Säure aus und wäscht den erhaltenen flockigen Niederschlag mehrmals mit Wasser, dann zeigen die Flocken nach Behandlung mit Akridinorangelösung unter dem Fluoreszenzmikroskop ein deutliches grünes Leuchten. Außerdem geben sie, in Übereinstimmung mit dem oben Gesagten, mit Chlorzinkjod Violett-färbung. Auf ihre Doppelbrechung hin wurden sie nicht untersucht.

C. Adsorptionsverdrängungsversuche

Die unter B. mitgeteilten Versuche ließen darauf schließen, daß die Fähigkeit, Akridinorange zur Grünfluoreszenz zu speichern, nur ganz bestimmten Stoffen, wie Zellulose und Stärke, zukommt. Es erhob sich nun die Frage, welcher Art die Bindung an das Objekt ist, die den Farbstoff

zu dieser Fluoreszenzfarbe veranlaßt. Die Unmöglichkeit, den grün fluoreszierenden Farbstoff mit CaCl_2 auszutreiben, hatte schon wahrscheinlich gemacht, daß die Bindung nicht elektrostatischer Natur sei. Das CaCl_2 wurde ja durch Höfler und Stiegler (1947) als Reagens zur Erkennung einer elektroadsorptiven Färbung mit basischen Farbstoffen eingeführt und hat sich seither in zahlreichen Vitalfärbearbeiten in dieser Funktion gut bewährt. Ich versuchte aber doch, ob sich nicht mit anderen Reagenzien eine Verdrängung des Farbstoffes aus seiner Bindung erzielen läßt. Die diesbezüglichen Versuche wurden vor allem nach zwei Richtungen hin unternommen: Einerseits untersuchte ich, ob nicht das, was dem doppelt geladenen Ca-Ion unmöglich war, einem mehrfach geladenen Ion gelingen würde, andererseits prüfte ich ein stark oberflächenaktives Kation. Für die erstere Möglichkeit wurde das Hexolnitrat gewählt, ein von Bungenberg in die Kolloidchemie eingeführter Kobaltkomplex mit sechswertigen Kationen. (Hergestellt nach der Vorschrift von Dubsky, angegeben bei Bungenberg de Jong und Teunissen 1938, S. 283.) Es zeigte sich, daß die tiefbraune Lösung dieses Salzes das Akridinorange aus grün fluoreszierenden Wattefasern nicht verdrängen konnte und daß bei Anwendung einer kombinierten, den Farbstoff und das Hexolnitrat enthaltenden Lösung eine Aufnahme des Farbstoffes in die Faser nicht verhindert werden konnte.

Ein stark oberflächenaktives Kation fand ich in dem im pharmazeutischen Handel erhältlichen Desinfektionsmittel Benirol der Firma Birupha, Wien, das aus Alkyldimethyl-benzyl-ammonium-chloriden besteht. Auch dieses Mittel vermag weder, Akridinorange aus Wattefasern auszutreiben, noch, im Gemisch mit dem Farbstoff angewandt, die Anfärbung der Fasern zu verhindern.

Interessanterweise gelingt aber eine Entfärbung grün fluoreszierender Zellulosefasern mit starker Salzsäure. Man kann hier Lösungsreihen herstellen, die Akridinorange in der Konzentration 1:10.000 und steigende Mengen Salzsäure enthalten. Behandelt man Zellulosefasern mit solchen Reihen, dann ergibt sich, daß die Grünfluoreszenz nur bis zu einem bestimmten HCl-Gehalt der Lösung aufrechterhalten wird. Oberhalb dieser Schwelle erscheinen die Fasern in einem ganz schwachen, weißlichen Licht. Diese Schwelle liegt für Wattefasern bei etwa 3 Mol HCl, für Ramiefaser zwischen 4 und 7 Mol HCl. Doch sind diese Bedingungen so extrem, daß man die angeführten Ergebnisse nicht ohne weiteres den übrigen genannten Adsorptionsverdrängungsversuchen gegenüberstellen darf. Die starke Salzsäure dürfte wohl eine Quellung der Fasern herbeiführen. Das Ausbleiben der Grünfluoreszenz in stark salzsaurer Lösung wäre dann also durch eine Störung der Micellarstruktur der Fasern zu erklären und nicht durch eine Adsorptionsverdrängung. Übrigens läßt sich auch an ausgefällter, „amorpher“ Zellulose eine solche Färbeschwelle Grün/Weißlich erreichen.

Aus den im Abschnitt C. beschriebenen Versuchen folgt also, daß eine Adsorptionsverdrängung des von Zellulosefasern zu grüner Fluoreszenz gespeicherten Farbstoffes nicht möglich ist. Die Akridinorange-Speicherung zu Grünfluoreszenz wird

nur unter extremen Bedingungen verhindert, die wahrscheinlich die Micellarstruktur der Zellulose verändern.

D. Beobachtung der Difluoreszenz.

Ziegenspeck (1943, 1949) hat uns gelehrt, die Fluoreszenz gefärbter Fasern im Polarisationsmikroskop zu untersuchen. Auftreten von polarisiertem Fluoreszenzlicht („Difluoreszenz“) führt er auf eine durch die Micellarstruktur der Fasern ausgerichtete Adsorption der Farbstoffteilchen zurück. Ich arbeitete mit einer etwas einfacheren Vorrichtung als Ziegenspeck (1949), der seine Beobachtungen im Auflichtdunkelfeld mit Blaulicht als Erregerstrahlung durchführte. Mir stand an unserem Institute die große Reichertsche Apparatur Lux UV zur Verfügung. Ich entfernte das zur normalen Beobachtung dienende Mikroskop und ersetzte es durch ein Polarisationsmikroskop, dessen Polarisator ich abmontiert hatte. Bei herausgeschobenem Analysator entsprach die Vorrichtung genau dem normalen Fluoreszenzmikroskop, wurde der Analysator eingeschoben, dann ließ sich beim Drehen des Objektes der Wechsel der Fluoreszenzfarbe mit genügender Deutlichkeit beobachten, wenn auch vielleicht nicht so brillant wie mit der von Ziegenspeck verwendeten Auflicht-Apparatur.

Versuch 8

Rot, gelb und grün fluoreszierende Fasern wurden auf ihre Difluoreszenz hin untersucht. Rote Fluoreszenz wurde erreicht durch Färbung von Oxyzellulosefasern (mit NO_2 oxydierte Watte, vgl. Kinzel 1953 b, S. 220) in

Normale Fluoreszenz, ohne Nicol-Prisma beobachtet	Fluoreszenz bei eingeschobenem Analysator		Objekt
	Objekt parallel zur Schwingungsebene des Analysators stehend	Objekt lotrecht zur Schwingungsebene des Analysators stehend	
rot goldgelb gelb grünlichgelb laubgrün	rot grünlichgelb grüngelb gelbgrün laubgrün	rot matt orangerot rötlichbraun matt bräunlich schwach grau	Oxyzellulose Ramie Ramie Watte Watte

der am schwächsten salzhaltigen Stufe der Akridinorange- CaCl_2 -Reihe. Goldgelbe Töne erhielt ich durch Behandeln von Ramiefasern mit der gleichen Lösung, gelbe Töne durch Behandeln von Ramiefasern mit der am stärksten salzhaltigen Lösung (0,18 mol CaCl_2) der Reihe. Gelbgrüne bzw. laubgrüne Fluoreszenzfarbe schließlich war durch längeres bzw. kürzeres Behandeln von Wattefasern und der letztgenannten Lösung zu erreichen. (Vgl. Kinzel 1953 b, Versuche 4 und 9.)

Dieser Versuch weist also zunächst nach, daß das ausgestrahlte Fluoreszenzlicht der mit Akridinorange gefärbten Fasern aus zwei Komponenten besteht: Einer grünen, polarisierten und einer roten, nicht polarisierten. Gelbe Fluoreszenz kommt durch eine Mischung dieser beiden Arten von Licht zustande und kann mittels des Polarisationsmikroskops in die beiden Komponenten zerlegt werden. Eine Deutung dieses Befundes soll im nächsten Abschnitt versucht werden.

Diskussion der Ergebnisse

Die von Strugger (1940) zuerst beschriebene Metachromasie der mit Akridinorange fluorochromierten Zellwände gehört heute zum gesicherten Bestand der der experimentellen Cytologie zur Verfügung stehenden Reaktionen. Mit neutralen oder schwach sauren Farbstofflösungen behandelte Zellwände fluoreszieren rot, geht man jedoch zu stärker sauren Lösungen über, dann erreicht man schließlich einen Schwellenwert des pH (für die meisten Zellwände lebender Zellen um pH 3 gelegen), unterhalb dessen die Fluoreszenz mehr oder weniger plötzlich nach Grün umschlägt. Ein entsprechender Effekt läßt sich durch Anwendung von Akridinorangelösungen erzielen, die wechselnde Konzentrationen eines Neutralsalzes, z. B. CaCl_2 , enthalten (Kinzel 1953 b). Lösungen mit hohem Salzgehalt wirken — nur der Membranfärbung, nicht der Plasma- und Vakuolenfärbung gegenüber — wie stark saure, Lösungen mit geringem Salzgehalt wie schwach saure Lösungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Versuche 2–5) im Vereine mit denen einer schon mehrfach genannten früheren Arbeit (Kinzel 1953 b, Versuche 1, 2, 3, 5, 7) zeigen nun, daß die Rot- und die Grünfluoreszenz je einer der beiden Hauptkomponenten der nicht inkrustierten pflanzlichen Zellwand zukommt: der Zellulose und dem Pektin. Reine Zellulose gibt nur grüne, höchstens gelbe, niemals aber rote Fluoreszenz. Von Zellulose völlig befreite Zellwände, die also zum größten Teil aus Pektin bestehen, geben nur rote und niemals grüne Fluoreszenz. Der Rot-Grün-Effekt der normalen Zellinwände kommt also dadurch zustande, daß in ihnen sowohl Zellulose als auch Pektin enthalten sind. Die in bestimmten pH-Stufen auftretende, meist ziemlich kräftige Rotfluoreszenz überdeckt dabei die in allen pH-Stufen vorhandene schwache Grünfluoreszenz, welche letztere nur dann in Erscheinung tritt, wenn in stark sauren oder salzhaltigen Lösungen die Rotfluoreszenz ausbleibt (Abb. 2).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit läßt sich weiter schließen, daß es sich bei der roten und grünen Fluoreszenz um zwei voneinander unabhängige Erscheinungen mit wohl definierbaren und unter sich verschiedenen Ursachen handelt. Das Zustandekommen der Rotfluoreszenz wurde schon früher (Kinzel 1953 b) geklärt. Es sind die in den Zellwänden enthaltenen Carboxylgruppen — seien es die natürlicherweise in den Pektinstoffen enthaltenen, seien es künstlich durch Oxydation der Zellulose eingeführte —, die die Kationen des Farbstoffes in einer sogenannten elektroadsorptiven Bindung speichern.

Wenn nämlich die im Micellargerüst eingebauten COOH-Gruppen dissoziieren, dann können sich die entstehenden H-Ionen aus elektrostatischen Ursachen nicht sehr weit von den unbeweglichen Anionen entfernen. Es wird sich an solchen Oberflächen, in denen Carboxylgruppen eingebaut sind, ein Schwarm von zwar an sich beweglichen, im ganzen jedoch innerhalb einer bestimmten Zone festgehaltenen H-Ionen bilden. Enthält die Lösung, die das Objekt umgibt, nun irgendwelche andere Kationen, dann kann die bisher durch elektrostatische Kräfte verhinderte Diffusion vonstatten gehen. Es werden H-Ionen in die Lösung abwandern und andere Kationen in die Zone um die COO-Ionen eindiffundieren, in der sie nach Einstellung

des Gleichgewichtes ebenso gefangen bleiben wie vorher die H-Ionen. Es ist dies der gleiche Vorgang, der auch Ionenaustausch oder Austauschadsorption genannt wird und der sich mit Hilfe der sog. Austauschzeolithe oder der neuer-

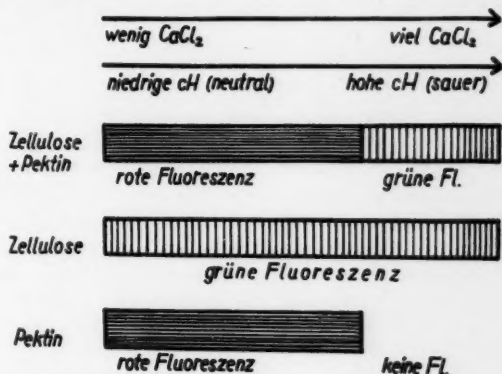


Abb. 2. Schema der Fluorochromierung der Zellwände und ihrer chemischen Bestandteile mit Akridinorange bei verschiedenen pH-Werten bzw. Salzkonzentrationen der Farblösung.

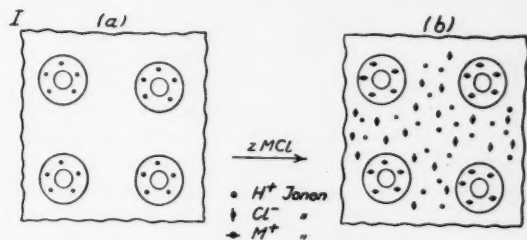


Abb. 3. Schema des Ionenaustausches an Kolloidteilchen. (Aus Mukherjee und Mitarb. 1937, Ausschnitt aus Fig. 7.)

dings industriell hergestellten Ionenaustauscher aus Kunstharz auch in technischem Maßstabe durchführen läßt.

Daß es sich bei der Speicherung basischer Farbstoffe an pflanzlichen Zellwänden um einen Ionenaustausch handelt, hat bereits Czaja (1934, S 555 ff.) durch eingehende Untersuchungen nachgewiesen. (Dort auch ältere Literatur.) Der Mechanismus des Ionenaustausches wurde schon vor Jahren von Mukherjee und Mitarb. (1937) klar formuliert, aus deren Arbeit die Abb. 3 entnommen ist. Die inneren Kreise stellen die Kolloidteilchen dar, die äußeren die Grenze der Zone, in der die abdissoziierten H-Ionen aus elektrostatischen Gründen gefangen sind (der

sog. elektrischen Doppelschicht). Wird nun ein Salz (MCl) zugesetzt, dann können dessen Kationen an die Stelle der H⁺-Ionen in der Doppelschicht treten. In der Lösung befinden sich dann freie H⁺-Ionen und die mit dem Salz zugesetzten Anionen. Dieses Modell läßt sich ohne Schwierigkeit auf die Farbstoffe übertragen. M⁺ bedeutet dann die Farbstoffkationen, die an Grenzflächen, die COOH-Gruppen enthalten, gegen die durch Dissoziation entstandenen H⁺-Ionen ausgetauscht werden.

Bei dieser Elektro- oder Austauschadsorption werden nun die Kationen des Akridinorange in einen Zustand versetzt, in dem sie rot fluoreszieren. Schon Strugger (1940) wies darauf hin, daß diese Fluoreszenzfarbe mit der hohen Konzentration des in der Membran gespeicherten Farbstoffes im Zusammenhang steht. Auch wässrige Lösungen des Farbstoffes fluoreszieren bei genügend hoher Konzentration rot. Zanker (1952) hat nun in einer eingehenden spektralanalytischen Untersuchung das Wesen des Konzentrationseffektes geklärt. Es handelt sich, wie schon auf Grund der Arbeiten Scheibes (vgl. Scheibe 1948) vermutet worden war (Höfler u. Pecksieder 1947, S. 108), um eine reversible Ionenaggregation. Die Einzelionen des Akridinorange, die in stark verdünnten Lösungen allein vorhanden sind, leuchten grün. Bei zunehmender Konzentration der Lösung lagern sich die Einzelionen in immer stärkerem Maße zu Doppelionen (Dimeren), vielleicht auch noch zu höheren Aggregaten zusammen. Diesen Aggregaten kommt nun die bekannte rote Fluoreszenz zu.

Ein interessantes Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht nun in der Beobachtung, daß der Struggersche Konzentrationseffekt bei einer elektroadsorptiven Bindung des Farbstoffes ausgeschaltet zu werden scheint. Das adsorbierte Akridinorange-Ion leuchtet immer rot, wie klein auch seine Konzentration sein möge. Offenbar bringt es der Adsorptionsvorgang mit sich, daß die in unmittelbarer Nähe der Carboxylgruppen festgehaltenen Farbstoffionen einander viel näher gebracht werden, als es ihrer auf das Gesamtvolumen der Zellwandsubstanz bezogenen Konzentration in der Membran entspricht. So kann wohl schon bei absolut kleinen Farbstoffkonzentrationen in der Zellwand unmittelbar an den adsorbierenden Oberflächen eine Bildung der rot leuchtenden Doppelionen erfolgen. Jedenfalls zeigen die Versuche 2 bis 6 der vorliegenden Arbeit, daß bei wirklich zellulosefreien Objekten auf die in schwach salzhaltigen Lösungen (zu beobachtende kräftige Rotfluoreszenz in den stärker salzhaltigen Lösungen eine ganz schwache, dunkle rote Fluoreszenz folgt, die schließlich in noch stärker salzhaltigen Lösungen völlig verschwindet. Eben diese Tatsache — daß nämlich der zur Rotfluoreszenz gespeicherte Farbstoff sich durch Neutralsalz restlos verdrängen läßt — ist der augenfälligste Beweis dafür, daß diese Art der Speicherung rein elektroadsorptiver Natur ist.

Die Grünfluoreszenz zellulosehaltiger Zellwände nach Färbung mit Akridinorange ist hingegen von anderer Natur. Dies geht schon aus der Art der Substanzen hervor, die diese Grünfluoreszenz zeigen können: Es sind dies die Stärke und die Zellulose (und wahrscheinlich auch das Chitin). Beide haben einen orientierten Micellarbau und sind darum doppeltbrechend, beide haben die Fähigkeit, mit Jodreagenzien unter gewissen Umständen blaue bzw. violette Färbungen zu geben. Andere Membran-

stoffe, die diese Eigenschaften nicht besitzen, wie die beim Herauslösen der Zellulose aus nativen Zellwänden zurückbleibenden Pektinstoffe oder aber die Gallerthüllen von Algen, geben auch keine Grünfluoreszenz mit Akridinorange, wohl aber, da sie Carboxylgruppen enthalten, die Rotfluoreszenz der elektroadsorptiven Akridinorangespeicherung.

Die im Abschnitt C beschriebenen Versuche zeigen zunächst mit besonderer Deutlichkeit die ja schon früher bekannte Tatsache, daß der zur Grünfluoreszenz gespeicherte Farbstoff bedeutend fester gebunden ist als die elektroadsorptiv gebundenen, rot fluoreszierenden Kationen. Während sich diese durch eine saure Pufferlösung oder durch mäßige Konzentrationen an einem Neutralsalz ganz leicht verdrängen lassen, ist dies bei dem zur Grünfluoreszenz gebundenen Farbstoff nicht der Fall². Diese Art der Speicherung kommt auch in stark sauren oder salzhaltigen Lösungen zustande. Erst unter extremen Bedingungen ändert sich das Färbbild, nämlich einerseits in sehr starker Mineralsäure, die wohl die Micellarstruktur der Zellwand verändert (Salzsäureversuche im Abschnitt C), andererseits z. B. in außergewöhnlich starker CaCl_2 -Lösung, die scheinbar den Farbstoff zur Bildung von rot fluoreszierenden Aggregaten veranlaßt (Kinzel 1953 b, Versuch 6). Unter normalen Verhältnissen jedoch ist die Grünfluoreszenz pH-unabhängig und salzfest.

Welcher Mechanismus kommt nun für diese Art der Farbstoffspeicherung in Frage? Es muß in diesem Zusammenhange betont werden, daß es sich wirklich um eine Speicherung und nicht etwa nur — wie Strugger seinerzeit (1940) annahm — um eine Imbibition der Zellwand mit der Farblösung handelt. Dies wurde dadurch nachgewiesen, daß die Objekte nach der Färbung nicht in eine farblose Lösung eingebettet wurden, sondern direkt in der Farblösung unter das Fluoreszenzmikroskop kamen. Dabei hob sich die mehr oder weniger starke grüne Fluoreszenz der Zellwände stets gut von dem (zwischen Objektträger und Deckglas) ganz schwachen, grünlichen Schimmer der Lösung ab, was bei einer bloßen Imbibition nicht der Fall sein könnte. Die Absolutkonzentration des zur Grünfluoreszenz gespeicherten Farbstoffes in der Zellwand ist natürlich, wie schon das makroskopische Bild zeigt, wesentlich geringer als die des zur Rotfluoreszenz gespeicherten, elektroadsorptiv gebundenen Farbstoffes. Sie muß aber, wie dargelegt, doch deutlich über der Farbstoffkonzentration in der Lösung liegen.

Welche Bindungsmöglichkeiten stehen nun einem Farbstoffion oder -Molekül an der Zellwand außer der Elektroadsorption noch zur Verfügung? Die außerordentlich feste Bindung des zur Grünfluoreszenz gespeicherten Farbstoffes ließe etwa an die Entstehung einer chemischen Verbindung zwischen Farbstoff und einem Zellwandbestandteil denken. Aber auch reine Zellulose (Wattefasern) gibt Grünfluoreszenz mit Akridinorange — und bei dieser ist ja ihrer Konstitution nach eine chemische Bindung basischer

² Diese Regel gilt scheinbar auch für andere Objekte mit anderem Bindungsmechanismus, wie dies etwa für den Zellkern von Höfler, Toth und Luhan (1949) dargelegt wurde.

Farbstoffe ausgeschlossen. So bleibt als dritte Möglichkeit nur die Annahme, daß das Haften des Farbstoffes an der Faser auf einem Mechanismus beruht, der irgendwie mit dem Micellarbau des Substrates zusammenhängt. Eine starke Stütze erhält diese Ansicht durch den experimentellen Befund, daß das grüne Fluoreszenzlicht linear polarisiert ist (Versuch 8). Nach Ziegenspeck bedeutet dies, daß die in der Faser enthaltenen Farbstoffteilchen durch die Micellarstruktur ausgerichtet sind und untereinander mehr oder weniger streng parallel liegen, so wie dies etwa bei den sogenannten substantiven Farbstoffen der Fall ist. Schon Ziegenspeck äußerte einige Vermutungen darüber, auf welche Art und Weise denn nun im speziellen bei diesem Färbemechanismus die Farbstoffteilchen vom Substrat festgehalten werden. (Vgl. Ziegenspeck 1941, Abb. 3, S. 248.) Frey-Wyssling (1937) sowie Kratky und Schoßberger (1938) lagerten in Zellulosefasern Kristallite aus Edelmetall ein, die sie durch Reduktion entsprechender Salze innerhalb der Faser erhielten. Die Größe und Lage dieser Kriställchen ließ sich polarisationsoptisch und röntgenographisch feststellen. Es handelt sich um längliche Teilchen von 10 bis 100 Å Dicke, die parallel zur Fasertextur ausgerichtet sind. Die Autoren schließen daraus, daß die Faser entsprechend dimensionierte und gelagerte Hohlräume enthält. (Vgl. dazu auch Meyer und Mark 1950, S. 384.) Neuere Arbeiten (Cramer 1952, 1954 und die dort zit. Lit.) vertreten die Ansicht, daß in solche Hohlräume, die in vielen makromolekularen, aber auch in manchen kleinmolekularen Stoffen vorkommen, Fremdmoleküle aufgenommen und festgehalten werden können. Dieses Festhalten geschieht hier nicht durch Betätigung von chemischen Valenzen im eigentlichen Sinne, sondern hauptsächlich durch das räumliche Zueinanderpassen von Wirtmolekül und Gastmolekül. Durch Annahme solcher „Einschlußverbindungen“ versucht man z. B. die Jodreaktionen der Stärke und Zellulose zu erklären. Ferner berichtet Staudinger (1952), daß Zellulose, die mit Cyclohexan durchtränkt worden war, diesen Kohlenwasserstoff bei 0,1 mm Vakuum und 100° Temperatur nicht restlos wieder abgibt. Ein kleiner Teil bleibt zurück, „zwischen die Fadenmolekeln der Cellulosen includiert, also rein mechanisch eingeklemmt“ (l. c. S. 152). Die Abb. 4 und 5 — entnommen aus dem Buche von Meyer und Mark — veranschaulichen den submikroskopischen Bau der Zellulosemembran. Abb. 4 stellt einen Längsschnitt durch ein einzelnes Micell, Abb. 5 einen Querschnitt durch mehrere Micelle dar. Man erkennt deutlich, daß es Spaltensysteme von zweierlei Größenordnung gibt: Innerhalb jedes einzelnen Micells existieren sehr schmale und lange Spalten (auf Abb. 4 sichtbar), während zwischen den einzelnen Micellen längliche Hohlräume von bedeutend größeren Dimensionen vorhanden sind (auf Abb. 5 im Querschnitt zu sehen). Dem entspricht auch die Tatsache, daß Frey-Wyssling (1937) aus röntgenographischen und anderen Daten auf die Existenz von Hohlräumen in der Größenordnung von etwa 10 Å und solchen von etwa 100 Å Durchmesser schließt (obwohl in der zitierten Arbeit die Möglichkeit eines gleitenden Überganges zwischen Hohlräumen dieser beiden Größenordnungen offengelassen wird).

Es ist nun durchaus wahrscheinlich, daß auch das Akridinorange entweder in den ganz feinen, intramicellaren Spalten oder in den spitz auskeilenden Enden der größeren, intermicellaren Hohlräume mechanisch eingeklemmt und festgehalten wird. (Daneben mögen freilich noch Wasserstoffbrücken oder andere Nebenvalenzkräfte an dem Vorgang beteiligt sein.) Diese Hypothese erklärt sowohl die Tatsache, daß der zur Grünfluoreszenz gespeicherte Farbstoff durch keine Reagenzien — soweit sie nicht die

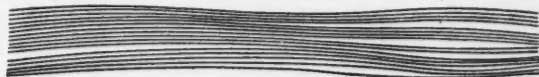


Abb. 4. Schematischer Längsschnitt durch ein Zellulose-Micell. (Aus Meyer und Mark, Makromolekulare Chemie, 2. Aufl., Fig. 120.)

Micellarstruktur verändern — aus der Zellwand verdrängt werden kann (ein mechanisches Festhaften kann natürlich durch chemische Mittel nicht gelöst werden) als auch die Ausrichtung der Farbstoffteilchen (die zur Verfügung stehenden Spaltensysteme sind ja selbst durch die Micellarstruktur parallel gerichtet).

Schon oben wurde angedeutet, daß der hier skizzierte Färbemechanismus eine Ähnlichkeit mit der sogenannten Substantivfärbung besitzt.

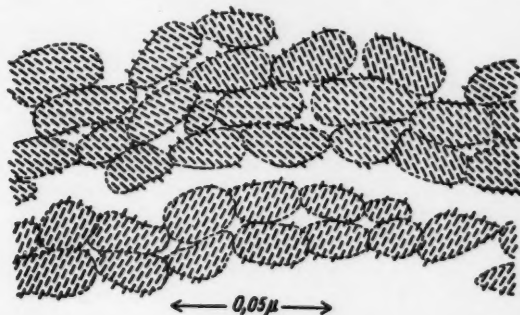


Abb. 5. Schematischer Querschnitt durch eine Anzahl von Zellulosemicellen. (Aus Meyer und Mark, Makromolekulare Chemie, 2. Aufl., Fig. 122.)

Die letztere ist allerdings von dem in Rede stehenden Phänomen dadurch unterschieden, daß bei ihr recht bedeutende Mengen der betreffenden Farbstoffe an der Faser haften bleiben, so daß die industrielle Färberei imstande ist, auf diesem Wege tadellose Ausfärbungen von Textilprodukten zu erzielen. Dagegen enthalten die nach Verdrängung des elektroadsorptiv gebundenen Akridinorange grün fluoreszierenden Zellwände nur einen äußerst geringen Rest des Farbstoffes, der bei makroskopischer Betrachtung kaum, im Hellfeldmikroskop oft gar nicht in Erscheinung tritt. Nur im Fluoreszenzmikroskop wird auch dieser geringe Farbstoffgehalt deutlich sichtbar.

Zur Deutung dieses Sachverhaltes ist zu bedenken, daß die substantiven Farbstoffe im eigentlichen Sinne zumeist langgestreckte und außergewöhnlich große Moleküle besitzen (vgl. die Formelbilder in Karrer 1950, S. 541 f.), die sich überdies noch zu kolloidalen Partikeln zusammenzulagern pflegen. Vielleicht steht nun diesen relativ großen Teilchen das reich ausgebildete intermicellare Hohlraumsystem zur Verfügung (vgl. Abb. 5), während die im Vergleich dazu recht kleinen Ionen des Akridinorange und, wie weiter unten gezeigt werden soll, auch anderer molekulardisperser Farbstoffe wohl nur in den spärlichen intramicellaren Spalten oder in den spitz auseinanderenden Enden der größeren Spaltensysteme eingeklemmt werden können. So mag denn der bekannten substantiven Vollfärbung das besprochene Phänomen als substantive Restfärbung an die Seite gestellt werden.

Die dargelegten Annahmen erklären auch die Tatsache, daß die substantive Restfärbung bei Akridinorange nur zur Grünfluoreszenz führt. Wenn nämlich die rote Fluoreszenz konzentrierter Akridinorangelösungen auf einer Ionenassoziation beruht, bei der sich die tafelförmigen Farbstoffionen mit ihren Breitseiten aneinanderlegen (Zanker 1952), dann kann es unter den Bedingungen der substantiven Restfärbung gar nicht zur Rotfluoreszenz kommen. Wenn nämlich eine intermicellare Spalte so eng ist, daß sie ein Akridinorange-Ion einklemmen kann, dann ist natürlich daneben kein Platz für ein zweites Ion. Daher erscheint hier die grüne Fluoreszenz der Einzelionen. Die elektroadsorptiv gebundenen Ionen hingegen, die an keine Spaltensysteme, sondern nur an eine COOH-Gruppenhaltige Oberfläche gebunden sind, werden in ihrer Polymerisation nicht nur nicht gehindert, sondern durch die Anreicherung an der Oberfläche sogar gefördert, so daß in diesem Falle die rote Fluoreszenz der Ionenassoziate in Erscheinung tritt. Das Fluoreszenzlicht ist hier nicht polarisiert, wahrscheinlich deshalb, weil an der freien Oberfläche eine statistische Anordnung der Ionenassoziate stattfindet.

In aller Kürze sei noch auf die öfters in der Literatur beschriebenen gelben Fluoreszenzfarben eingegangen, die manche Objekte unter bestimmten Bedingungen mit Akridinorange geben. Soweit die gelb fluoreszierenden Zellenteile innerhalb des Protoplasten liegen — wie die von Höfler (1947 b, S. 595) beschriebenen „akridinogilbenden Zellsäfte“ nekrotischer Mooszellen oder die von Flasch und Kinzel (1954) aufgefundenen Inhaltskörper von *Buxus* —, ist eine Deutung der Fluoreszenzfarbe noch nicht möglich. Auch die von Härtel (1951, S. 342) beschriebenen, bei pH 2,5 grell gelb leuchtenden Zellwände von *Pirola*-Epidermen sind wohl ein vorläufig noch nicht durchschaubares Phänomen und auch wegen der Salzfestigkeit der Färbung eine Ausnahme. In allen jenen Fällen jedoch, in denen die gelbe Fluoreszenz im Bereiche des EP einer Zellwand als Übergang zwischen der Grünfluoreszenz der substantiven Restfärbung und dem roten Leuchten der elektroadsorptiven Färbung auftritt — wie z. B. bei den chitinhaltigen Zellwänden von Pilzen (Höfler und Peck-sieder 1947) oder bei Textilfasern (Kinzel 1953 b) —, ist es bereits möglich, Vermutungen über das Zustandekommen des gelben Leuchtens zu

äußern. Zanker (1952) stellte in seinen spektralphotometrischen Messungen fest, daß die gelbe Übergangszone, die man an wässrigen Lösungen zwischen der Grünfluoreszenz der verdünnten und der Rotfluoreszenz der konzentrierten Lösungen wahrnimmt, nicht durch eine kontinuierliche Verschiebung von Spektralbanden zustande kommt, sondern durch eine Überlagerungserscheinung. An solchen Lösungen, in denen die immer grün fluoreszierenden Einzelionen des Farbstoffes und die stets rot leuchtenden Doppelionen in einem geeigneten Mischungsverhältnis vorhanden sind, nimmt das unbewaffnete Auge einen aus der Überlagerung von grünem und rotem Fluoreszenzlicht resultierenden gelben Farbton wahr. In Versuch 8 der vorliegenden Arbeit wird nun bei polarisationsoptischer Betrachtung des gelben Fluoreszenzlichtes ebenfalls die Tatsache deutlich, daß das gelbe Licht aus einer grünen (hier polarisierten) und einer roten Komponente besteht. Dieser Befund führte mich zu der Vermutung, daß die gelbe Fluoreszenz im Übergangsbereich dort auftreten könnte, wo in Zellwänden mit ausgeprägter, dichter Micellierung nur relativ wenige Carboxylgruppen enthalten sind. Dadurch würde die in diesem Falle starke Grünfluoreszenz der substantiven Restfärbung von der relativ schwachen Rotkomponente nicht gleich völlig überdeckt werden können, so daß infolge Überlagerung der beiden Arten von Licht die gelben Töne entstehen. Bei weiterem Vorrücken in der pH-Skala wird dann entweder der elektroadsorptiv gebundene Anteil des Farbstoffes und damit die rote Komponente des Fluoreszenzlichtes schließlich doch so stark, daß das resultierende Fluoreszenzlicht einen roten Farbton erhält, oder aber — bei Zellwänden, die besonders arm an COOH-Gruppen sind (Watte!) — die Rotkomponente des Fluoreszenzlichtes wird auch unter optimalen Färbbedingungen nie der Grünfluoreszenz überlegen: Dann geben die betreffenden Objekte auch in neutraler Lösung bzw. in reinem Wasser nur gelbe und niemals rote Fluoreszenz mit Akridinorange (Kinzel 1953 b, Versuch 9). Bei den lockerer micellierten Zellwänden saftiger Gewebe hingegen, die zumeist reichlich Pektin und damit viele Carboxylgruppen enthalten, würde das sehr schwache grüne Leuchten der substantiven Restfärbung von der starken Rotfluoreszenz der elektroadsorptiv gebundenen Farbionen gleich nach ihrem Auftreten völlig überdeckt, so daß keine Übergangszone in Erscheinung tritt. Durch die vorliegenden Untersuchungen wird also die bereits von Höfler und Pecksieder (1947, S. 109 und 113) geäußerte Vermutung bedeutend erhärtet, wonach die gelbe Fluoreszenz der Pilzzellwände dadurch verursacht sei, daß sie dichter gebaut seien und weniger Adsorptionspunkte enthielten als die normalen Zellulosemembranen.

Übrigens ist Akridinorange nicht der einzige Farbstoff, der der Zellwand gegenüber in zwei voneinander unabhängigen Färbemechanismen reagieren kann. Sehr viele basische Farbstoffe dürften zu einem ähnlichen Verhalten fähig sein. Zwar spricht der Augenschein zunächst gegen eine solche Annahme. Bestimmt man nämlich mit einem Hellfeldfarbstoff den Entladungspunkt einer Zellwand, dann gibt sich dieser Punkt nicht durch eine Umfärbung, sondern durch eine Entfärbung der Membran zu erkennen. Es scheint hier nur die Alternative „Farbstoffspeicherung oder keine Farb-

stoffspeicherung“ zu geben, während zunächst nichts auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen Färbemechanismen hindeutet. Doch hat jüngst Patel (1951) gründliche Untersuchungen über die Adsorption von Methylenblau an Ramie und Oxyzellulose veröffentlicht, deren Resultate mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ausgezeichnet übereinstimmen. Auch Patel kommt zu dem Ergebnis, daß Zellulose mit einem geringen Gehalt an Carboxylgruppen den Farbstoff gerichtet adsorbiert, und zwar werden einzelne Moleküle des Farbstoffes — die in ihrer flach-länglichen Gestalt denen des Akridinorange sehr ähnlich sind — mit ihrer Längsachse parallel zur Achse der Faser festgelegt. Bei Oxyzellulose aber, die mehr Methylenblau speichert, treten Veränderungen der Lichtabsorption des adsorbierten Farbstoffes auf, die darauf schließen lassen, daß eine Assoziation der Farbstoffionen stattfindet. Patels Kurven weisen außerdem darauf hin, daß diese Assoziatete kaum orientiert sind³. Wir finden also hier die gleichen Erscheinungen wieder, wie sie oben für das Akridinorange beschrieben wurden. Der große Unterschied zwischen Methylenblau und Akridinorange besteht aber nun darin, daß bei letzterem der Übergang der monomeren in die polymere (bzw. dimere) Form den großen Sprung in der Fluoreszenzfarbe von Grün nach Rot auslöst, während derselbe Übergang bei ersterem nur eine recht geringe Verschiebung der Lichtabsorption zur Folge hat. Der monomeren Form des Methylenblau entspricht die sogenannte M-Bande von 656,5 m μ Wellenlänge, der dimeren Form die sogenannte D-Bande mit 600 m μ (Rabinowitch und Epstein 1941). Es tritt also nur eine geringfügige Farbverschiebung von Blau nach Violett ein. Patel benötigte sehr komplizierte Apparaturen, um die monomere und die dimere Form des adsorbierten Farbstoffes exakt auseinanderzuhalten, während bei der Betrachtung eines mit Akridinorange gefärbten Präparates der brillante Farbwechsel auch dem Ungeübten sofort ins Auge fällt. Immerhin ist z. B. bekannt, daß sich die locker micellierten, pektinreichen Zellwände weicher, saftiger Gewebe bei elektroadsorptiver Färbung mit Methylenblau oft in violetter Farbtöne tingieren, der wohl auf die polymere Form des Farbstoffes zurückgeht und der roten Fluoreszenz der polymeren, elektroadsorptiv gebundenen Akridinorange-Ionen entspricht. Dicht micellierte Pflanzenfasern, Watte, Filterpapier färben sich hingegen mit Methylenblau im orthochromatischen, rein blauen Tone, der durch die substantiv festgehaltenen Einzelmoleküle des Farbstoffes bedingt wird und der Grünfluoreszenz des in analoger Weise festgehaltenen Akridinorange entspricht. Die substantiv Restfärbung läßt sich im Hellfeld nur an Objekten vom Typus der Textilfasern demonstrieren, die eine immerhin merkliche Menge des Farbstoffes säurefest zurückhalten können. Aber auch dann erscheinen diese

³ Aus Fig. 5 und 6 der zitierten Arbeit ist nämlich deutlich zu ersehen, daß die der monomeren Form des Methylenblau zugeordnete M-Bande (656,5 m μ) nur dann in Erscheinung tritt, wenn der Absorptionskoeffizient parallel zur Faserachse betrachtet wird. In der lotrecht zur Faserachse aufgenommenen Absorptionskurve tritt die M-Bande kaum in Erscheinung. Die den assoziierten Ionen zugeordnete D-Bande (600 m μ) hingegen wird durch einen solchen Wechsel in der Betrachtungsrichtung nur wenig beeinflusst (u. zw. eher in umgekehrtem Sinne).

Fasern nur in größerer Menge, makroskopisch betrachtet, deutlich gefärbt. Im Mikroskop hingegen wird man im Hellfeld den substantiv zurückgehaltenen Farbstoffrest an Fasern leicht, an lockerer micellierten Zellwänden sicher übersehen. Bei letzteren ist es nur mit Fluorochromen unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich, den äußerst geringen, substantiv festgehaltenen Farbstoffrest nachzuweisen.

Aus allen diesen Gründen ist auch im Hellfeld die Messung des Entladungspunktes von Zellmembranen nicht so exakt durchzuführen wie mit Hilfe von Akridinorange im UV-Licht. Handelt es sich um sehr locker micellierte, pektinreiche Zellwände, bei denen die substantive Restfärbung im Hellfeld nicht in Erscheinung tritt, dann läßt sich wohl der Entladungspunkt als Schwelle gefärbt-farblos in der pH- oder Salzreihe festlegen, wie dies z. B. bei Drawert (1937) für Membranen fixierter Zellen und bei Kinzel (1953 a) für Algen-Gallerten beschrieben ist. Je dichter micelliert aber eine Zellwand ist, je stärker also die substantive Restfärbung auch im Hellfeld sichtbar wird, desto unsicherer werden die EP-Bestimmungen. Im Extremfall der Textilfasern ist schließlich entlang der pH- oder Salzreihe im Hellfeld nur mehr ein allmählicher Übergang von stärkerer zu schwächerer Färbung zu bemerken. Der geringe Unterschied im Farbton — die stärker gefärbten Fasern müßten mehr violett, die schwächer gefärbten mehr blau sein — ist ohne spezielle optische Hilfsmittel nicht zu erkennen. Mit Akridinorange behandelte Fasern hingegen zeigen unter den gleichen Bedingungen im Fluoreszenzmikroskop den brillanten Farbübergang von Rot über Gelb nach Grün, der auch unter diesen Umständen oft noch eine einigermaßen sichere Festlegung eines Entladungspunktes oder -bereiches möglich macht. Diese Befunde bringen also eine neue Bestätigung bzw. eine physikochemische Interpretation der schon bekannten Tatsache, daß bei der vitalfärberischen Untersuchung der Zellmembran (und wohl auch noch anderer Zellenteile) dank der günstigen Eigenschaften des Akridinorange die fluoreszenzoptische Methode der Untersuchung im Hellfeld bei weitem überlegen ist.

Es sei jedoch abschließend nochmals betont, daß alle diese Überlegungen nur für „Zellinwände“ im Sinne von Schwarz (1924) gelten. Verholzte, verkorkte oder sonstwie inkrustierte Zellwände wurden nicht in den Kreis der Betrachtungen gezogen. Nur die von Höfler und Pecksieder (1947) untersuchten chitinhaltigen Zellwände von Pilzen scheinen sich in ihrem Verhalten den Zellinwänden anzuschließen.

Zusammenfassung

1. Die vollständige Entfernung der Zellulose aus „Zellinwänden“ im Sinne von Schwarz (1924) — aus solchen Zellwänden also, die nur aus Stoffen der Zellulosegruppe und der Pektingruppe bestehen — mit Hilfe von Cuoxam (Kupferoxydammoniak) dauert je nach dem physikalischen und chemischen Bau der betreffenden Membranen verschieden lange, zumeist einige Tage bis Wochen, manchmal auch mehrere Monate.

2. Wirklich zellulosefreie Membransubstanzen geben mit Akridinorange nur rote und niemals grüne Fluo-

reszenz — und zwar sowohl die auf chemischem Wege von Zellulose befreiten Zellinwände als auch eine Algengallerte, die von vornherein keine Zellulose enthält. In dem Bereich, in dem an nativen Zellinwänden grüne Fluoreszenz erscheint, bleibt an zellulosefreien Objekten jede Fluoreszenz aus.

3. Grüne Fluoreszenz mit Akridinorange wird außer von zellulosehaltigen Membranen noch von ungefällter Zellulose und von Stärke gegeben, von Objekten also, die sämtlich mit Jodreagenzien blaue bis violette Färbungen zu geben imstande sind und zumeist auch Doppelbrechung zeigen.

4. Die Grünfluoreszenz beruht nicht auf einer Imbibition der Membran mit der Farblösung, sondern der Farbstoff wird von der Zellulosekomponente wirklich gebunden. Eine Verdrängung des so festgelegten Farbstoffes ist weder mit einem mehrwertigen Kation noch mit einem stark oberflächenaktiven Kation möglich.

5. Fasern, die nach Behandlung mit Akridinorange grün fluoreszieren, zeigen bei Betrachtung durch ein Nicol-Prisma die Erscheinung der „Difluoreszenz“ (Ziegenspeck 1949), rot fluoreszierende Fasern nicht. Dies deutet darauf hin, daß die grün fluoreszierenden Farbteilchen parallel zur Fasertextur ausgerichtet sind, die rot fluoreszierenden nicht. Die gelbe Fluoreszenz, die zuweilen im Übergangsbereich zwischen Grün und Rot auftritt, läßt sich polarisationsoptisch in eine grüne, polarisierte und eine rote, nicht polarisierte Komponente zerlegen.

6. Auf Grund dieser Befunde wird angenommen, daß diejenige Einlagerung von Akridinorange in Zellinwände, die zur Grünfluoreszenz führt, auf einem der Substantivfärbung nahestehenden Mechanismus beruht, bei dem die Farbionen in entsprechend dimensionierten Intermicellarräumen der Zellulosekomponente mechanisch festgeklemmt, inkludiert (oder jedenfalls nicht durch Ionen- oder sonstige Hauptvalenzbindung festgehalten) werden. Ein solcher Färbemechanismus wird aus Gründen, die auf S. 89 f. näher angeführt sind, als substantive Restfärbung bezeichnet und so von der substantiven Vollfärbung der substantiven Farbstoffe im engeren Sinne unterschieden.

7. Der von Strugger (1940) zuerst beschriebene Grün-Rot-Effekt der mit Akridinorange fluorochromierten pflanzlichen Zellwand erweist sich also aus zwei typischen „Zustandsreaktionen“ im Sinne von Kinzel (1953 a, S. 28) zusammengesetzt. Ein grünes Fluoreszenzlicht, das sich unter dem Nicol-Prisma als polarisiert erweist, deutet auf einen bestimmten Micellarbau des Objektes hin, der auf Grund von langgestreckten intra- oder intermicellaren Hohlräumen eine gerichtete Inklusion von Farbstoffionen ermöglicht. Zellulose, Chitin und Stärke besitzen einen solchen Micellarbau, Pektin und Algen-Gallerte nicht. Die beiden letztgenannten Objekte geben daher niemals Grünfluoreszenz mit Akridinorange. Rote Fluoreszenz hingegen läßt auf einen Gehalt des Objektes an dissoziierten sauren Gruppen schließen. Bei

Zellinwänden von Blütenpflanzen kommen dabei wohl nur COOH-Gruppen in Frage, bei Algen auch SO_3H -Gruppen. Die Farbspeicherung geht hier nach dem Mechanismus der Elektroadsorption (in der Chemie meist Ionenaustausch genannt) vor sich, wobei infolge der Konzentrationserhöhung in der adsorbierenden Grenzfläche eine Assoziation der Farbstoffionen zu rot leuchtenden Dimeren stattfindet. In stark saurer oder salzhaltiger Lösung wird die Dissoziation der sauren Gruppen oder ihrer Salze zurückgedrängt. In diesem Zustand ist eine Elektroadsorption nicht mehr möglich.

8. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß die an manchen Objekten in einigen Stufen der pH- oder Salzreihe zwischen Grün- und Rotfluoreszenz auftretende gelbe Fluoreszenz (Höfler u. Pecksieder 1947, Höfler 1947 b) auf einer Überlagerungserscheinung beruhe. Wenn nämlich ein sehr dicht micelliertes Objekt relativ wenige saure Gruppen enthält, dann kann vielleicht die grüne Fluoreszenz des hier in reichlicherem Maße substantiv gebundenen Farbstoffes so stark werden, daß sie von der roten Fluoreszenz der elektroadsorptiv gebundenen Farbionen nicht gleich nach deren Auftreten überdeckt wird, sondern durch Überlagerung mit derselben einen gelben Farbton ergibt, wie er ja auch in einem bestimmten Konzentrationsbereich der wässrigen Lösung aus dem gleichen Grunde auftritt.

9. Die substantive Restfärbung ist nicht auf das Akridinorange beschränkt. Auch andere basische Farbstoffe scheinen ähnlich reagieren zu können (vgl. Patel 1951). Die auf Grund dieses Mechanismus festgehaltenen Farbstoffmengen sind jedoch oft so gering, daß sie nur bei Fluorochromen im UV-Licht sicher nachzuweisen sind, bei Hellfeldfarbstoffen aber leicht übersehen werden können.

Literatur

- Bungenberg de Jong, H. G., und P. H. Teunissen, 1938: Negative, nicht amphotere Biokolloide als hochmolekulare Elektrolyte I. Kolloid-Beih. 47, 254.
 Cramer, F., 1952: Einschlußverbindungen. Angew. Chem. 64, 437.
 — 1954: Einschlußverbindungen. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
 Czaja, A. Th., 1930: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. I. Substantive Farbstoffe. Planta 11, 582.
 — 1934: Untersuchungen... II. Basische Farbstoffe. Planta 21, 531.
 Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Flora 132, 91.
 Flasch, A., und H. Kinzel, 1954: Rasche Bildung von Entmischungskörpern in Zellsäften von *Buxus sempervirens*. Protoplasma 44, 266.
 Frey-Wyssling, A., 1937: Röntgenometrische Vermessung der submikroskopischen Räume in Gerüstsubstanzen. Protoplasma 27, 372.
 Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. Protoplasma 40, 338.
 Höfler, K., 1946: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. Anz. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Jg. 1946, S. 41.
 — 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.

- Höfler, K., 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, Bd. 156, S. 585.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biol. gen. 19, 90.
- und E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Öst. Bot. Z. 94, 99.
- und H. Schindler, 1952: Algengallerten im Vitalfärberversuch. Öst. Bot. Z. 99, 529.
- und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie 2, 250.
- A. Toth und M. Luhan, 1949: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf ElektroadSORPTION an der Eiweißphase? Protoplasma 39, 62.
- Karrer, P., 1950: Lehrbuch der organischen Chemie. 11. Aufl. Stuttgart.
- Kinzel, H., 1952: Der Entladungspunkt pflanzlicher Zellwände und seine Abhängigkeit von deren Pektin Gehalt. Anz. Österr. Akad. Wiss., Jg. 1952, Nr. 15, S. 247.
- 1953 a: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Öst. Bot. Z. 100, 25.
- 1953 b: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma 42, 209.
- Kratky, O., und F. Schoßberger, 1938: Ein Beitrag zur Micellarstruktur der Zellulose. Z. physik. Chem. B 39, 145.
- Meyer, K. H., und H. Mark, 1950: Makromolekulare Chemie. 2. Aufl. Leipzig.
- Mukherjee, J. N., R. P. Mittra und S. Mukherjee, 1937: Die charakteristischen Eigenschaften saurer Stoffe in kolloiddispersen Lösungen im Gegensatz zu Säuren in molekulardispenser Form. Kolloid-Beih. 47, 1.
- Patel, G. M., 1951: Optical investigations on Oxycelluloses. Dissertation ETH. Zürich.
- Rabinowitch, E., and L. F. Epstein, 1941: Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue. J. Amer. chem. Soc. 63, 69.
- Scheibe, G., 1948: Wechselseitige Bindung und Energieübertragung in Molekeln in flüssiger Phase. Z. Elektrochem. 52, 283.
- Schwarz, F., 1924: Metachromatische Färbungen pflanzlicher Zellwände durch substantive Farbstoffe I. Ber. dtsch. bot. Ges. 42 (21).
- Staudinger, H., 1952: Zur Konstitutionsaufklärung makromolekularer Kunststoffe. Angew. Chem. 64, 149.
- Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Z. Naturw. 73, 97.
- Zanker, V., 1952: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversibler Polymerisate“) des Akridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung. Z. physik. Chem. 199, 225.
- Ziegenspeck, H., 1941: Dichroskopie und Metachroskopie. Der Dichroismus und Metachroismus besonders substantiv gefärbter natürlicher Pflanzenmembranen als ein Hilfsmittel zum Erforschen der physikalisch-chemischen Beschaffenheit derselben. Protoplasma 35, 237.
- 1943: Über die linear-polarisierte Fluoreszenz von Faserfärbungen. Kolloid-Z. 105, 3.
- 1948: Die Emission polarisierten Fluoreszenzlichtes (Difluoreszenz) durch gefärbte Zellulose- und Kutinmembranen von Pflanzen. In: „Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie“, 1. Sonderband der Zeitschrift „Mikroskopie“, Wien. S. 71.

Monotrope Plastiden-Metamorphose

Von

A. Frey-Wyssling, F. Ruch und X. Berger

Institut für Allgemeine Botanik der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

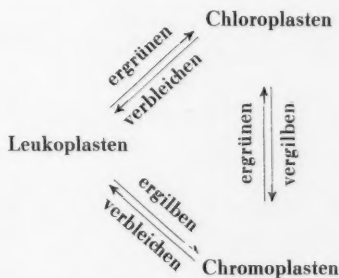
Mit 16 Textabbildungen

(Eingelangt am 31. Januar 1955)

Nach Schimper (1885) ist die Plastiden-Differenzierung ein reversibler Prozeß, denn er schreibt auf Seite 3 seiner klassischen Arbeit:

„Diese Metamorphosen werden nicht bloß einmal durchgemacht, sondern das gleiche Chromatophor vermag verschiedene Male nacheinander abwechselnd zu einem Chloroplasten, Leukoplasten oder Chromoplasten zu werden; die Chromoplastenform stellt zwar in den meisten Fällen eine definierte, nicht mehr rückgängig zu machende Metamorphose dar; es fehlt aber nicht an Ausnahmen von dieser Regel, an Fällen, wo ein Chromoplast wieder zu einem Chloroplasten, wohl auch einem Leukoplasten werden kann, um sich später wieder zu einem Chromoplasten umzuwandeln.“

Schematisch kann dies folgendermaßen dargestellt werden:



Die Auffassung der beliebig häufigen und in beliebiger Richtung erfolgenden Plastidenumwandlung ist zur allgemeinen Lehrmeinung geworden. Sie wurde später sogar noch erweitert, indem die Rückverwandlung von Chloroplasten in Mitochondrien postuliert wurde (Emberger

1920/21, Friedrichs 1922, Cholodnyj 1923). Da man damals die Proplastiden (Strugger 1953, 1954) wegen ähnlicher Färbbarkeit mit Mitochondrien verwechselte, würde dies besagen, daß sich die ausdifferenzierten Plastiden wieder in embryonale Proplastiden zurückzuverwandeln vermögen.

Bei unserem Studium der Cytologie mangelhaft ergrünender Chloroplasten kamen wir jedoch zum Schlusse, daß die reversible gegenseitige Umwandlung bloß in sehr beschränkter Weise möglich erscheint, wenn man die verschiedenen Plastidentypen nicht nur nach ihrem Pigmentgehalt, sondern nach ihrer physiologischen Leistung beurteilt. So muß man von den Leukoplasten verlangen, daß sie nicht nur farblos, sondern auch mit der Fähigkeit begabt sind, Stärke aufzubauen, und farblos gewordene „leukoplastenähnliche“ Chloroplastenreste darf man nicht lediglich auf Grund des cytologischen Bildes als Proplastiden deuten, ohne ihre Entwicklungsfähigkeit geprüft zu haben.

Im folgenden sollen die Chloroplastenveränderungen bei den bekannten Erscheinungen der Chlorose und des Etiolelements sowie die Entwicklungshemmung der Proplastiden in panaschierten Blättern näher untersucht werden, wobei auch die Chromoplastenbildung zur Sprache kommen soll.

1. Chlorose

Bei der Chlorose muß man streng unterscheiden zwischen der Anlage chlorotischer Blätter von Pflanzen, die falsch ernährt werden, und der Vergilbung der grünen Blätter gesunder Pflanzen, die nachträglich chloroseerzeugenden Bedingungen ausgesetzt werden. Im ersten Falle wird die Differenzierung der vorhandenen Proplastiden zu Chloroplasten verhindert, während im zweiten Falle bereits ausdifferenzierte Chloroplasten vergilben. Es besteht somit ein prinzipieller Unterschied, indem im einen Falle die Metamorphose Leukoplast \rightarrow Chloroplast unterdrückt wird, im anderen dagegen vollzogen worden ist.

Bei der Heilung der Eisenchlorose mit Eisensalzen hat Zimmerman (1893) die Umwandlung kleinerer farbloser Plastiden in normale Chloroplasten beobachtet. Dies ist nun keineswegs eine reversible Umwandlung von erst ergrünten, dann vergilbten und durch Eisenchlorid wieder ergrünten Plastiden, sondern es handelt sich lediglich um eine verspätete Ausdifferenzierung der Chloroplasten. Die Vorstufen dieser ergrünenden Chromatophoren werden als farblose Plastiden beschrieben, die nach Zimmerman im Gegensatz zu gesunden Leukoplasten nicht vermögen, Stärke aus den den kranken Blättern angebotenen Zuckern aufzubauen.

Um die eventuelle Rückverwandlung ergrünter Chloroplasten in Leukoplasten zu untersuchen, erzeugten wir bei ursprünglich gesunden Pflanzen Chlorose.

Kalkchlorose. Hierzu eignen sich die schwach alkalischen Böden (pH 7,7–7,85) des rechten Zürichseeufers, auf denen die gefürchtete Kalk-

chlorose der Weinrebe auftritt. Acidiphile Pflanzen, im Gewächshaus als Topfkultur gezogen, werden auf solchem Boden über kurz oder lang chlorotisch.

Als Objekte dienten jüngere Pflanzen von *Gardenia florida*, *Ginkgo biloba*, *Viola odorata* und *Luzula purpurea*. Die *Luzula* ging auf diesem Boden zugrunde. In allen übrigen Fällen wurden die neu entwickelten Blätter chlorotisch. Die vorhandenen großen Blätter blieben erhalten (z. B. *Gardenia*) oder sie wurden marmoriert, indem das Chlorophyll den Blattrippen entlang vergilbte (*Viola*). Während die chlorotischen Jungblätter durch Zurückversetzung in saure humose Erde (für *Gardenia* pH 4,5) willig ergrünen, bleiben die bleichsüchtigen Altblätter marmoriert. Man erhält den Eindruck, daß diese eine vorzeitige Vergilbung eingeleitet haben, eventuell um notwendige Aufbaustoffe an die Meristeme der Vegetationspunkte abzugeben. In diesem Falle würden sich diese Blätter ähnlich wie bei der Hungerchlorose verhalten (s. u.). Nie ist es gelungen, solche vergilbende Blätter wieder zum Ergrünen zu bringen. Wenn die Chloroplasten ihr Chlorophyll vollständig verloren haben, können sie nicht wieder ergrünen, da offenbar ein irreversibler Abbauprozess eingesetzt hat.

Im Feldversuch tritt die Kalkchlorose sehr launisch auf. Die Krankheit kann bei trockenem Wetter unauffällig bleiben, um unvermutet bei nasser Witterung heftig auszubrechen. Untersucht wurden die chlorotischen Jungblätter von *Iris germanica* und *Hydrangea hortensia*.

Abb. 1 zeigt ein chlorotisches neben einem gesunden Blatt von *Hydrangea*. Charakteristischerweise fehlt die normale Granenstruktur (Abb. 2) bei den der Chlorose unterworfenen Chloroplasten. In Abb. 3 sind Chloroplasten der grünen Zone des chlorotischen Blattes abgebildet. Sie müssen als nicht voll ausdifferenzierte Chloroplasten betrachtet werden. In der weißen Spitze des Blattes erscheinen die Plastiden dagegen degeneriert (Abb. 4), und es gelingt nicht mehr, sie zum Ergrünen zu bringen. Häufig dorren die Spitzen der Blätter mit degenerierten Plastiden ab. Ähnliche Verhältnisse zeigen Abb. 5 und 6, wo die Chloroplasten aus einem gesunden *Iris*-Blatte granuliert, aus einem chlorotischen Blatte, mit der gleichen Optik aufgenommen, dagegen homogen erscheinen.

Es dünkt uns wichtig, daß die scheinbar granenfreien Chloroplasten von Abb. 3 und 6 geringe Mengen Chlorophyll enthalten. Diese unvollkommen entwickelten Chloroplasten sind daher offenbar befähigt, Chlorophyll zu synthetisieren. Es ergibt sich somit die Frage, ob die Chlorose wirklich durch eine mangelhafte Chlorophyllsynthese oder durch die fehlende Ausdifferenzierung der Granen bedingt ist. Da nämlich die Granen das grüne Chromo-Lipoprotein des Chloroplasten enthalten (z. B. Frey-Wyssling und Steinmann 1953), könnte die Chlorose ebenso gut durch eine mangelhafte Synthese des spezifischen Lipoproteids, an welches das Chlorophyll gebunden wird, verursacht sein. Das Dogma, die Chlorose sei lediglich durch die fehlende Chlorophyllsynthese bedingt, bedarf daher einer Überprüfung, denn dieser Mangel kann theoretisch ebenso gut die Folge wie die Ursache der fehlenden Granendifferenzierung sein.

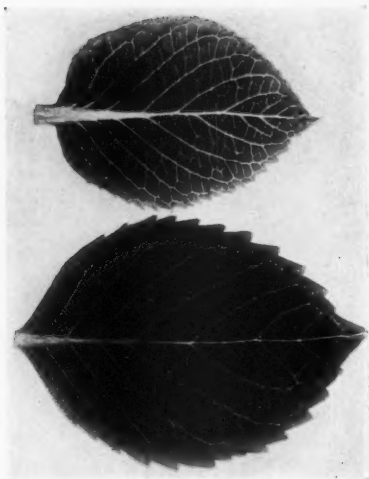


Abb. 1. Oben chlorotisches, unten gesundes Blatt.

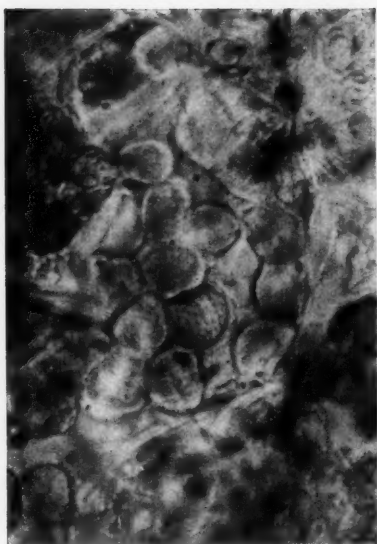


Abb. 2. Normale Chloroplasten.

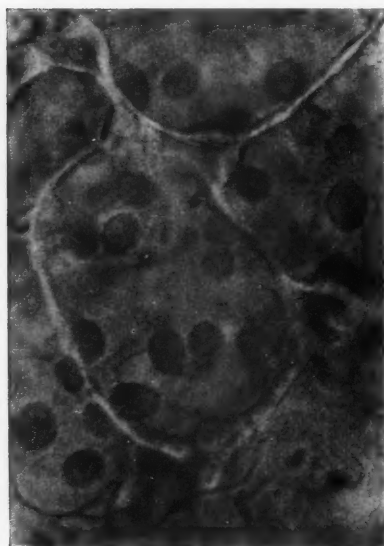


Abb. 3. Chlorotische Chloroplasten.



Abb. 4. Degenerierende Plastiden.

Hydrangea hortensia.

Abb. 2—4 Vergr. 2000 \times .

Nach Went (1943) ist für das Ergrünen der Blätter nicht nur eine richtige Ernährung der Wurzeln mit allen Mineralsalzen und Spurenelementen unerlässlich, sondern es bedarf zur Verhinderung der Chlorose zusätzlich einer guten Belüftung der Wurzelkrone. Dort sollen Stoffe synthetisiert werden, die für das Stengelwachstum und das Ergrünen der Blätter unerlässlich sind. Diese Schlußfolgerung wird aus Versuchen mit Tomaten gezogen, die auf einer vollständigen Nährlösung mit pH 6 chlorotisch wurden, wenn das ganze Wurzelsystem in die Lösung tauchte. Sobald

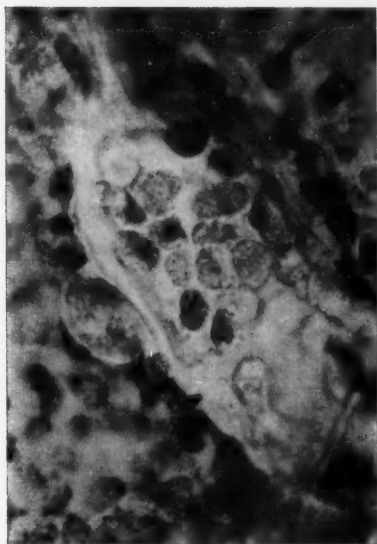


Abb. 5. Chloroplasten aus normalem Blatt.



Abb. 6. Chloroplasten aus chlorotischem Blatt.

Iris germanica.

Abb. 5 und 6 Vergr. 2000 \times .

jedoch der Wasserspiegel so gesenkt wurde, daß sich die Wurzelkrone in der Luft befand, erfolgte ein freudiges Wachstum des Stengels und ein Ergrünen der Blätter. Durchperlen von Luftbläschen durch die Nährlösung genügte nicht, um die Ergrünung auszulösen. Wir haben eine ähnliche Beobachtung mit unseren Gardenien gemacht, die als Topfkultur in der oben erwähnten Erde mit pH 7,8 chlorotisch erkrankt waren. Von den 24 Jungsträuchern ergrüneten indessen plötzlich bei zwei Exemplaren die embryonalen Blätter, während bei allen übrigen Pflanzen die Krankheit ständig zunahm. Es erwies sich dann, daß die Wurzeln der beiden grünen Pflanzen aus dem Topf in die Ziegelschrot-Unterlage hinunter gewachsen waren. Da das Ziegelschrot völlig nährstofffrei, jedoch gut durchlüftet ist,

kann das Ergrünen nicht auf einer zusätzlichen Ernährung beruhen, sondern es könnte im Sinne von Went durch die Luftversorgung der Wurzeln bedingt sein.

Hungerchlorose. Beim Tabak kann im Gewächshaus an Topf- und Wasserkulturen eine auffällige Alterschlorose beobachtet werden. Da der Tabak ein überdurchschnittliches Nährsalzbedürfnis besitzt, zeigt er, in den üblichen Töpfen und Gefäßen kultiviert, nach einiger Zeit Hungererscheinungen. Dies äußert sich in einer frühzeitigen Blattrife. Die Blätter vergilben wie beim Reifen des Tabaks im Felde und schicken ihre Baustoffe in die Vegetationsspitze zur Bildung neuer Blattanlagen hinauf. Während solche Blätter im Felde absterben, wenn sie nicht gepflückt werden, können sie sich im Gewächshause monatelang frisch erhalten, weil sie durch keine Atmosphärien zerstört werden, aber vor allem auch deswegen, weil sie schon in jungem Zustande ihre Assimilationstätigkeit haben aufgeben müssen. Nachdem sie vollständig vergilbt sind, können auch die gelben Pigmente verschwinden, so daß schließlich der Trieb von der Basis bis über einen Meter hoch mit schneeweißen Blättern behangen ist. Es macht einen merkwürdigen Eindruck, wenn Pflanzen der Sorte Mt. Calme brun, die sich im Felde durch besonders grüne Blätter auszeichnen, durch diese Hungerkur mit Ausnahme der Spitzenblätter wie Albinos schneeweiß erscheinen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigt vorerst eine normale Vergilbung der Chloroplasten, dann verschwinden die Granen und die Plastiden degenerieren zu kleinen Resten, die nicht wieder zum Ergrünen gebracht werden können.

Analoge Beobachtungen wurden bei durch Kalkchlorose verursachter Ausbleichung der Chloroplasten von *Myosotis scorpioides*, *Fragaria vesca* und *Aucuba japonica* gemacht.

2. Etiollement

Die Cytologie der Chlorose hat es meistens mit einer Entwicklungshemmung der Plastiden zu tun. Die landläufige Auffassung, daß die normalen Chloroplasten ausbleichen und dann unter Umständen wieder ergrünen, trifft in den seltensten Fällen zu; das Ergrünen tritt vornehmlich in Blättern mit noch unentwickelten Chloroplasten auf. Dagegen ist es möglich, durch das Etiollement ausdifferenzierte Chloroplasten zum Vergilben zu bringen, weshalb mit etiolierten Pflanzen Versuche zur Abklärung der reversiblen Chloroplastenumwandlung vorgenommen wurden.

Als Versuchspflanze diente *Chlorophytum comosum*. Stellt man diese Zimmerpflanze dunkel, so ist der Durchmesser (55μ) ihrer prächtig granulierten Chloroplasten (Abb. 7) schon nach zwei Tagen auf die Hälfte reduziert (Abb. 8), d. h. sie haben drei Viertel ihrer Querschnittsfläche eingebüßt. Nach drei Tagen ist der Durchmesser auf 20μ zusammengeschrumpft (Abb. 9). Hand in Hand mit dem Chloroplastenschwund geht ihre Vergilbung. Diese erfolgt unregelmäßig, so daß das Blatt gesprenkelt erscheint. Die hier abgebildeten Chloroplastenpräparate wurden von einem

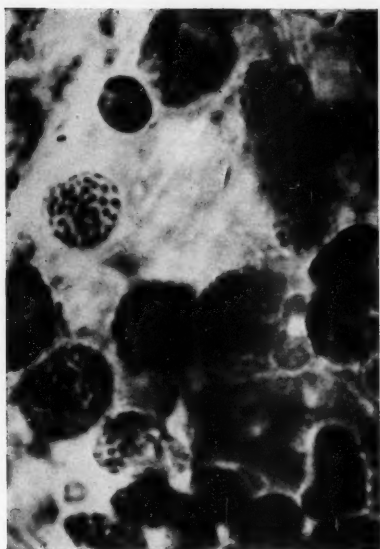


Abb. 7. Chloroplasten aus normal grünem Blatt.

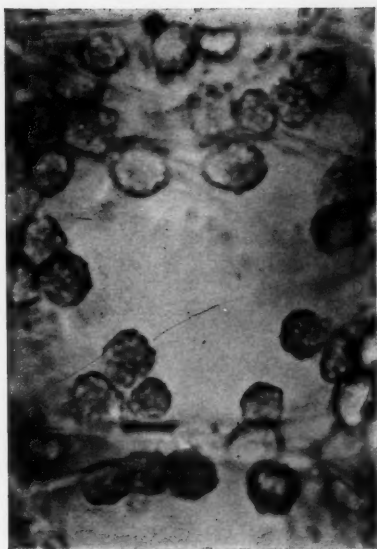


Abb. 8. Chloroplasten nach zweitägiger Etiolierung.

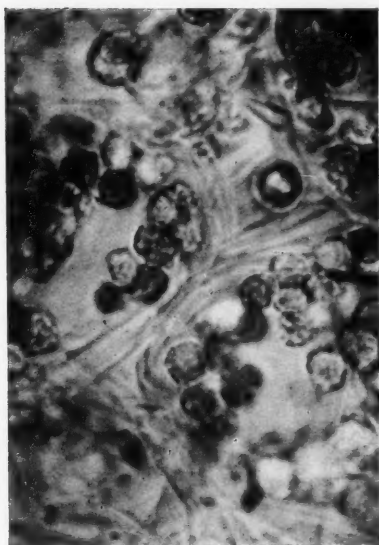


Abb. 9. Chloroplasten nach dreitägiger Etiolierung.

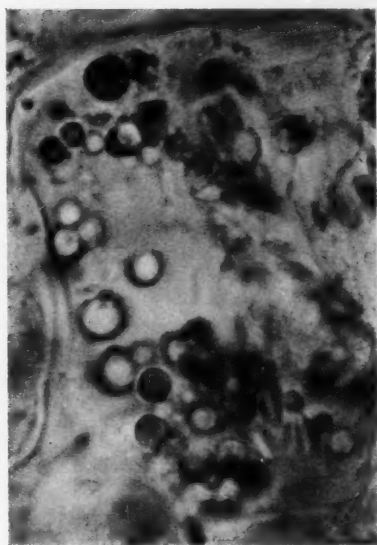


Abb. 10. Chloroplasten kurz vor dem Verdorren des Blattes.

Chlorophytum comosum.

Abb. 7—10 Vergr. 2000 \times .

vergilbten Blattflecken hergestellt. Nach 4–5 Tagen wird das Blatt vollständig gelb. Die Chloroplasten verlieren dann ihre Granen (Abb. 10), worauf das Blatt abstirbt. Ein Wiederergrünen der granenfrei gewordenen Plastiden ist unmöglich.

Der rasche Verlauf des Plastidenabbaues, der hier geschildert worden ist, zeigt sich namentlich bei den älteren Blättern. Diese sind offenbar ähnlich wie bei der herbstlichen Laubvergilbung bereit, ihre Aufbau-
stoffe rasch zu mobilisieren und an die überdauernden Organe abzugeben.

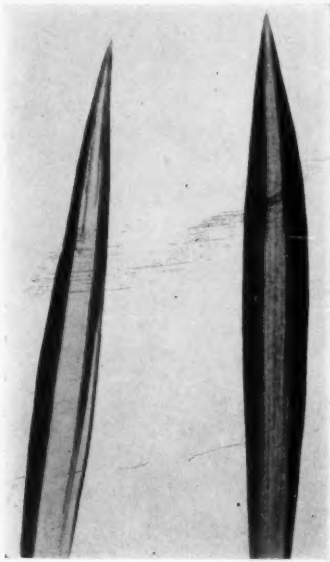


Abb. 11. *Chlorophytum comosum*. Blatt bei guter Belichtung gewachsen mit vollständig weißen Streifen (links). Blatt bei schlechter Belichtung gewachsen mit hellgrünen Streifen (rechts).

Strugger (1937) beschreibt eingehend, wie bei der Ergrünung etiolierter *Helodea*-Plastiden die sekundäre Granenstruktur bei der Belichtung in Erscheinung tritt. Man könnte hieraus den Eindruck gewinnen, daß die Granulierung der funktions-tüchtigen Chloroplasten durch das Etiolement verschwinden und dann wieder erscheinen könne. In Tat und Wahrheit handelt es sich bei dieser gründlichen Studie jedoch um das erstmalige Ergrünen der Plastiden in etiolierten Jungtrieben. Dadurch, daß die Leukoplasten durch Lichtmangel in ihrer Differenzierung zu Chloroplasten behindert werden, erzeugen sie neben Stärke Carotinoide, die in großen Lipoidtropfen gespeichert werden. Man kann sich des Eindrucks nicht erwehren, daß eine Art Lipophaneroze auftritt, die dann bei der Belichtung erst wieder rückgängig gemacht werden muß, bis die typische Granenstruktur der Chloroplasten installiert werden kann.

Es handelt sich also bei diesen Etiolierungsversuchen nicht um eine reversible Umwandlung von Chloroplasten in farblose Plastiden, sondern um eine hinausgeschobene Differenzierung von Leukoplasten, deren normale Entwicklung durch den Lichtentzug gestört wurde.

3. Panaschierte Blätter

In panaschierten Blättern finden sich kleine farblose Plastiden (Schürrhoff 1924, Schumacher 1928). Diese dürfen als Leukoplasten angesprochen werden, denn sie sind befähigt, Stärke aufzubauen. Es handelt sich daher um Proplastiden, die in ihrer Entwicklung auf der Leuko-

plastenstufe stehengeblieben sind. Die Entwicklungshemmung ist genetisch bedingt. Die Möglichkeit des Ergrünens kann latent vorhanden sein und eventuell phänotypisch ausgelöst werden, wie das folgende Beispiel zeigt.

Von *Chlorophytum comosum* wird meistens eine panaschierte Sorte als Zierpflanze gehalten. Beidseitig des Mittelnerven des grasartigen Blattes verlaufen breite weiße Streifen, die von grünen Blatträndern besäumt sind (Abb. 11). In den grünen Streifen sehen die Chloroplasten normal



Abb. 12. Plastiden aus einem weißen Streifen.

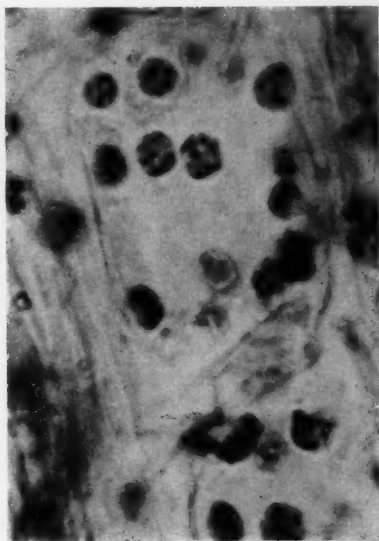


Abb. 13. Chloroplasten aus einem hellgrünen Streifen.

Chlorophytum comosum.

Abb. 12 und 13 Vergr. 2000 \times .

aus (Abb. 7), während die Plastiden in den weißen Streifen sehr klein sind und nur vereinzelt auftreten (Abb. 12). Sie enthalten jedoch Stärkekörner, wodurch sie sich als Leukoplasten zu erkennen geben. Im Fluoreszenzmikroskop fehlt ihnen jegliche Rotfluoreszenz, so daß sie also völlig frei von Chlorophyll sind.

Setzt man diese panaschierte *Chlorophytum*-Sorte einem ungenügenden Lichtgenuß aus, werden die weißen Streifen der in Entwicklung begriffenen Blätter hellgrün, während die Streifen der alten Blätter weiß bleiben. Die Mesophyllzellen der hellgrünen Streifen enthalten kleine Chloroplasten mit deutlicher Granenstruktur (Abb. 13). Die Anzahl dieser Plastiden ist indessen viel größer als jene in den weißen Streifen (Abb. 12).

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß die Leukoplasten der weißen Streifen ausgewachsener Blätter nicht mehr zu grünen Chloroplasten zu evolvieren vermögen. Bei der Entwicklung der hellgrünen Streifen ist dies jedoch möglich unter gleichzeitiger Vermehrung der Plastidenzahl. Da beide Blatttypen sowohl mit weißen als auch mit hellgrünen Streifen aus dem gleichen Meristem hervorgehen, darf man annehmen, daß die Initialzellen sowohl für die weißen wie für die hellgrünen Streifen ursprünglich gleich viele Proplastiden zugeteilt erhalten haben. In den hellgrünen Streifen ist deren Zahl jedoch vermehrt worden, in den weißen Streifen dagegen klein geblieben.

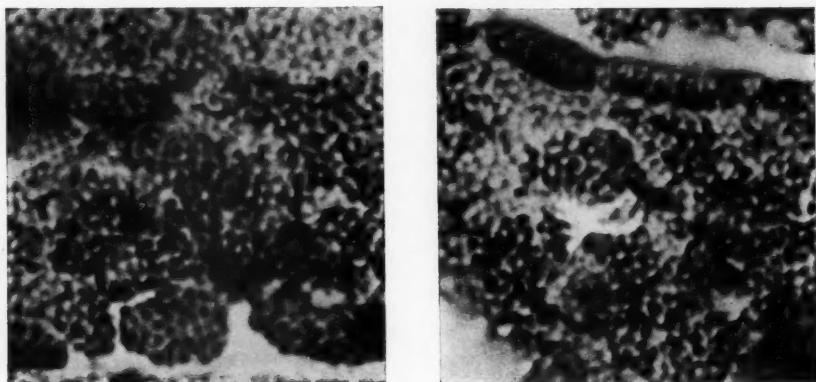


Abb. 14. Chromoplasten aus jungen Honigblättern; a in Aufsicht, b oben zwei Plastiden in Profilansicht. Vergr. 2200 \times .

Ranunculus repens.

4. Chromoplasten

Da in den bleichsüchtigen Blättern nach unseren Untersuchungen in erster Linie Entwicklungshemmungen der Proplastiden oder dann Degenerationserscheinungen ausgebildeter Chloroplasten vorliegen und wir in unserem Material eine wirklich reversible Rückverwandlung von Chloroplasten in Leukoplasten nicht beobachten konnten, prüften wir auch die in der Literatur behauptete reversible Umwandlung von Chromoplasten in Chloroplasten.

Dabei zeigte sich, daß man mindestens zwei verschiedene Typen von Chromoplasten unterscheiden muß.

Chromoplasten mit Granenstruktur. Dieser Typus ist z. B. in den Honigblättern junger Blüten von *Ranunculus repens* verwirklicht. Chromoplasten aus der Basis der Honigblätter besitzen mikroskopisch den gleichen Bau wie Chloroplasten. Es liegen deutlich wahrnehmbare Granen vor (Abb. 14), die flache Scheibchen vorstellen, welche geldrollen-

artig übereinandergeschichtet sind wie im Chloroplastenmodell nach Strugger (1951). Nur sind die Granen chlorophyllfrei und dafür durch Carotinoide leuchtend gelb gefärbt. Nach Schimper (1885, S. 117) gehen bei *Ranunculus Steveni* die Chromoplasten aus kleinen stärkehaltigen Chloroplasten hervor.

In geöffneten gelben Blüten (z. B. *Caltha palustris*) findet man Chromoplasten, die durch Pigmenttropfen vakuolisiert erscheinen. Offenbar sind durch Entmischung Lipidtropfen entstanden, die die Carotinoide in sich aufweisen. Oft erstarren diese Massen, und das Stroma kann bis zur Unkenntlichkeit schwinden. Schimper (1885, S. 106) bezeichnet daher offene Blüten und reife Früchte für die Untersuchung der Chromoplasten als „durchaus ungeeignet“. Wir legen indessen gerade auf dieses allgemein verbreitete Stadium der Plastidenevolution Wert, weil es zeigt, daß diese mit einer Degeneration, Zersetzung und Auflösung des Plastidenfeinbaus endet.

Chromoplasten mit kristallisierten Carotinoiden. Häufig erscheinen die Carotinoide in den Chromoplasten kristallisiert (Wurzel von *Daucus Carota*). Diese Bildungen haben mit der Pigmentanhäufung in den Granen nichts zu tun, denn die Kristallisation findet im Stroma statt.

Bei der Gelbfärbung der Fruchtkörper von *Chara* beobachteten wir, wie sich Chloroplasten in solche Chromoplasten umwandeln. Die Chloroplasten, die eine normale Granenstruktur aufweisen, werden etwas kleiner und zwischen den Granen erscheinen Carotinkriställchen. Es handelt sich also nicht um einen Farbwechsel der Granen, sondern um eine Stoffausscheidung im Stroma. In den reifen Fruchtkörpern wird das Stroma teilweise oder ganz resorbiert, worauf die Carotinoide als unförmliche Klumpen in den Zellen liegen.

Man erhält also den Eindruck, daß beim Abbau der Chloroplasten als Nebenprodukte Carotinoide entstehen, die zufolge ihrer Unlöslichkeit im vorliegenden Substrat kristallisieren und nach der Resorption der abgebauten Proteine als Ausscheidungssstoffe liegen bleiben.

5. Diskussion

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß die Plastidenumwandlungen keine reversiblen Metamorphosen, sondern einen einseitig gerichteten, monotropen Entwicklungsablauf vorstellen. Dieser kann grob schematisch folgendermaßen dargestellt werden:

Proplastid → Leukoplast → Chloroplast → Chromoplast

Nach der Theorie der reversiblen Metamorphose müßte die Kette ebenso leicht rückwärts wie vorwärts durchlaufen werden. Es ist jedoch aus der Literatur ersichtlich, daß nur eine sehr beschränkte Rückverwandlungsmöglichkeit besteht. Nach Ulrich (1924) können durch Stickstoffhunger vergilbte Chloroplasten bloß regeneriert werden, wenn die erlittene Größenabnahme geringfügig ist; und Gratzky (1931) schreibt in ihrer Arbeit über die Degeneration der Chloroplasten in Farnprothallien, die

Chloroplastenumwandlung sei nur so lange reversibel, als bloß ein geringer Teil ihrer Reservestoffe abgebaut sei. Diese Beispiele, die aus dem Schrifttum über die Chlorose beliebig vermehrt werden können, zeigen, daß ein Chloroplast, der in Degeneration begriffen ist, nur gerettet werden kann, wenn diese Vorgänge eben erst eingeleitet sind. Haben sie dagegen richtig eingesetzt, so ist der Plastid verloren. Er kann sich dann in „Leukoplasten, die keine Stärke aufbauen“ (Cholodnyj 1923) oder in „mitochondrienartige“ Teilchen verwandeln (Emberger 1920/21, Friedrichs 1922), von denen Küster (1951, S. 753) sagt: „Es ist kein Beispiel dafür bekannt, daß in plastidenfrei gewordenen Zellen irgendwelche Chondriosomen zu Plastiden geworden wären.“ Da früher degenerierte Plastiden mit Mitochondrien verwechselt wurden, heißt dies, daß die Plastiden unter keinen Umständen wieder in das differenzierungsfähige Stadium der Proplastiden zurückgeführt werden können.

Ähnlich verhält es sich mit der Chromoplasten-Metamorphose. Der Beginn dieser Umwandlung muß als die Einleitung der Plastidendegeneration und -resorption betrachtet werden. Gewiß gibt es Frühstadien der Chromoplasten, wo die Granenstruktur der Chloroplasten noch so einwandfrei erhalten ist, daß ein Wiederergrünen möglich wird; aber dies ist, wie allgemein anerkannt wird, ein sehr ephemeres Stadium, das normalerweise durch die Plastidendegeneration abgelöst wird. Sie äußert sich entweder in einer Art Lipophaneroze, wobei die durch Entmischung frei gewordenen Lipoide die Carotinoide als Lipochrome in sich aufnehmen; oder die Carotinoide beginnen im Stroma zu kristallisieren, wodurch sie sich dem Stoffwechsel entziehen und daher eher als Ausscheidungsstoffe denn als intermediäre Metabolite betrachtet werden müssen. Wie namentlich von der herbstlichen Laubvergilbung bekannt ist, geht mit diesem Vorgang eine Resorption der Proteinkomponente der Plastiden bis zu deren völligem Schwund einher.

Eine gewisse Schwierigkeit besteht, Frühstadien der Chloroplasten gegenüber den Leukoplasten abzugrenzen. Bei der durch die Chlorose bewirkten Hemmung der Chloroplastenentwicklung bleiben die Plastiden auf einer Stufe stehen, die man morphologisch als Leukoplasten bezeichnet. Zimmermann (1893) schreibt indessen, daß die bleichen, durch Eisen ergrünungsfähigen Plastiden weder im Lichte noch im Dunkeln aus 10% Rohrzuckerlösung Stärke aufzubauen vermögen, wodurch sich diese chlorotischen Plastiden physiologisch von den gleich aussehenden Zwergplastiden panaschierter Blätter unterscheiden. Wenn man die Leukoplasten mit den Amyloplasten identifiziert, so darf man jedoch solche der Stärkesynthese unfähige Plastiden wohl nicht als Leukoplasten bezeichnen. Ihr Verhalten gleicht jenem sich normal entwickelnder Chloroplasten, die während ihrer Ausdifferenzierung ebenfalls keine Stärke aufbauen, sondern diese Tätigkeit erst aufnehmen, wenn sie ihre assimilatorische Funktion übernommen haben und zur Bildung transitorischer Stärke übergehen. Vom physiologischen Standpunkte aus ist daher nicht jeder farblose Plastid ein Leukoplast. Man muß deshalb für die in Entwicklung begriffenen Chloroplasten, in denen nach Strugger (1953, 1954) die Vermehrung der

Granen stattfindet, einen besonderen Namen zur Verfügung haben, für den wir die Bezeichnung *Jungchloroplast* von *Strugger* (1954) übernehmen.

Es kann auf Grund der in dieser Arbeit entwickelten Gesichtspunkte das in Abb. 15 dargestellte Entwicklungsschema der Plastiden vorgeschlagen werden.

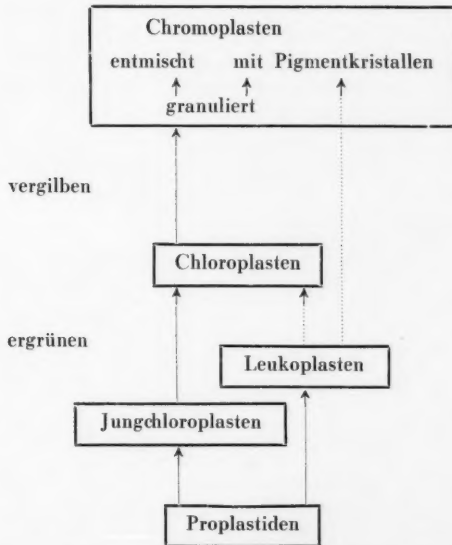


Abb. 15. Schema der monotropen Plastiden-Metamorphose.

Strugger (1954) unterscheidet in der Evolution der Proplastiden drei Stadien: nämlich amyloplastische, stärkefreie und ergrünende Proplastiden. Bleiben sie auf der ersten Stufe stehen, können sie sich zu Leukoplasten entwickeln. Das stärkefreie Stadium, das normalerweise nur von kurzer Dauer ist, kann in chlorotischen Blättern zu einem Dauerstadium werden, so daß stärkefreie Jungchloroplasten entstehen. Es ist noch un- abgeklärt, ob der chlorotischgeschädigte Jungchloroplast nicht imstande ist, seinen Granenapparat zu entwickeln und deshalb nicht ergrünt, oder ob es sich, wie allgemein angenommen wird, tatsächlich um ein Un- vermögen, Chlorophyll aufzubauen, handelt. In etiolierten Jungtrieben (*Strugger* 1937) und in panaschierten Blättern vermögen die aus Licht- mangel oder aus genetischen Gründen in ihrer Entwicklung gehemmten Jungchloroplasten Stärke zu synthetisieren; sie werden also zu Leuko- plasten. Dies zeigt, daß es eigentlich keinen prinzipiellen Unterschied zwi- schen Jungchloro- und Leukoplasten gibt. Im einen Falle gehen die Plastiden normalerweise frühzeitig dazu über, den Assimilationsapparat in Form der Granensysteme aufzubauen und erst später transitorische Stärke zu bilden, während im zweiten Falle die Ausbildung eines sekun-

dären Granenapparates unterbleibt oder wie bei den sogenannten Amylochloroplasten nachträglich, z. B. als Folge verspäteter Belichtung von unterirdischen Stengelteilen, eine Ergrünung eintritt.

Die Verhinderung der normalen Entwicklung zu Chloroplasten kann zu Schädigungen der Jungchloroplasten führen. So hat Strugger (1937) bei etiolierten *Helodea*-Jungchloroplasten die Bildung von Lipoidtropfen, die Xanthophyll speichern, beobachtet. Die damalige Bezeichnung jener offenbar durch Entmischung entstandenen Gebilde als Primärgranen darf heute als hinfällig betrachtet werden. Interessant ist, daß der Jungchloroplast bei nachträglicher Belichtung vermag, diese Lipoidansammlungen wieder zu dispergieren und zur normalen Granenbildung zu schreiten.

Die normale Entwicklung der Chromoplasten geht von den Chloroplasten aus. Durch Abbau des Chlorophylls können granuliert Chromoplasten mit gelben Granen entstehen. Aber dieser Zustand ist nur in jungen Chromoplasten festzustellen. Er wird alsbald von einer Zersetzung der Plastidenstruktur abgelöst, wobei große Lipoidtropfen auftreten, die die Carotinoide als Lipochrome speichern, oder kristallisierte Carotinoide im Schosse des farblosen Stromas erscheinen.

Chromoplasten können indessen auch aus farblosen Plastiden hervorgehen, wie im Falle der α -Carotin produzierenden Chromatophoren der Möhrenwurzel; oder an der Differenzierung zu Chlorophyllkörnern behinderte Jungchloroplasten können unter Lipophaneroze zu gelben Farbstoffträgern werden. Wieweit Jungchloroplasten ohne Chlorophyllbildung zu granulierten Chromoplasten zu evolvieren vermögen, muß erst abgeklärt werden; einem solchen Nachweis kommt wegen der Frage der Korrelation zwischen Granenbildung und Chlorophyllsynthese erhebliches Interesse zu. Nach Sager und Palade (1954) unterbleibt die Lamellierung der Plastiden von *Chlamydomonas*, wenn die Chlorophyllbildung unterdrückt wird.

Alle diese Möglichkeiten sind im Schema von Abb. 15 angedeutet. Es zeigt sich eine fortlaufende Differenzierung und Umgestaltung der Plastiden, die monotrop in einer bestimmten Richtung verläuft und, bei den Chromoplasten angelangt, schließlich zur Degeneration führt. Reversible Umwandlungen treten nicht mehr auf, nachdem die Umwandlung zu einem nächsten Differenzierungsgrad genügend weit fortgeschritten ist.

Die wichtigste Folgerung dieser Feststellung ist die Erkenntnis, daß differenzierte Chloroplasten nicht in Proplastiden zurückverwandelt werden können. Bei den Moosen (Kaja 1954) und Braunalgen (v. Wettstein 1954), wo persistierende Chloroplasten vorkommen, gehen die kleinen Chromatophoren der Eizellen durch Teilung und Verkleinerung aus bestehenden Plastiden hervor. In der Eizelle der Anthophyten können die Proplastiden jedoch kaum aus ausdifferenzierten Plastiden entstehen. Vielmehr muß in den gametenbildenden Meristemen stets ein Vorrat an Proplastiden vorhanden sein. Das Kontinuitätsgesetz von Schimper bezieht sich deshalb bei höheren Pflanzen nicht auf die ausgewachsenen Plastiden, sondern nur auf die Proplastiden. Man muß daher die Angabe von Kaja (1954, S. 105), bei den Angiospermen finde eine „Plastidenreduktion

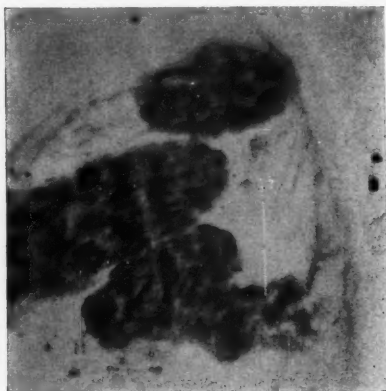
zu monogranulären Proplastiden“ statt, nicht als einen ontogenetischen Zyklus innerhalb einer Generation, sondern als ein phylogenetisches Geschehen auffassen, da bei den von ihm untersuchten niederen Pflanzen keine Proplastiden gefunden worden sind.

Es ist tatsächlich nicht denkbar, wie die komplizierte Struktur der Chloroplasten sich wieder in den einfachen Bau der Proplastiden zurückverwandeln sollte. Leider konnte hinsichtlich der Granenentwicklung in den Proplastiden bisher noch keine Einigkeit erzielt werden. Nach *Strugger* (1950) entstehen die Granen durch Autoreproduktion eines in den Proplastiden vorhandenen Primärgranums, während sie nach *Heitz* und *Maly* (1953) durch Entmischung des Proplastidenstromas anfallen sollen. Schließlich beobachtet *Leyon* (1954 a), daß Lamellen als fingerförmige Auswüchse aus dem Primärgranum herauswachsen; sie werden als Stromalamellen gedeutet, auf denen erst später die Doppellamellen der Granen entstehen.

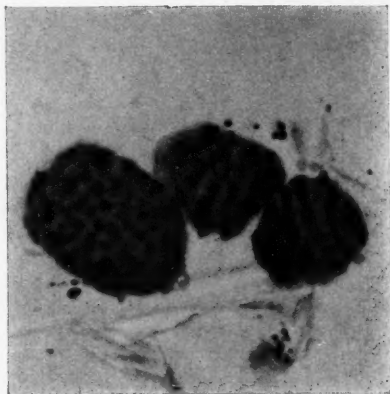
Das Primärgranum erscheint im Elektronenmikroskop als kristalliner Körper mit makromolekularen Kugelmolekülen und Gitterkonstanten von der Größenordnung 250 Å (*Heitz* 1954, *Leyon* 1954 b). Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß kristalline makromolekulare Substanzen bei den identischen Reproduktionsvorgängen eine Rolle spielen, denn wir kennen kristalline Viren und kristalline Spermienköpfe (*Wilkins* und *Randall* 1953). In den beiden erwähnten Fällen handelt es sich um Nukleoproteide. Es wäre deshalb von großer Bedeutung, wenn ein solcher Nachweis für das kristalline Primärgranum gelingen würde. Seine Färbbarkeit mit Kernfarbstoffen und seine starke Elektronenstreuung im Elektronenmikroskop sprechen zwar in dieser Richtung. Ein Beweis liegt jedoch nicht vor. *Metzner* (1952 a, b) hat sich bemüht, den Nukleinsäure-Nachweis in den ausgewachsenen Chloroplasten auf färberischem Wege mit Methylgrün, Pyronin und der Feulgenschen Nuklealreaktion zu führen, und er kommt zum Schlusse, daß im Stroma Ribo-, in den Granen dagegen Desoxyribonukleinsäure vorhanden sei. Diesen Befund können wir durch Abb. 16 näher präzisieren, in der Granen im UV-Licht deutlich abgebildet worden sind. Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, Spektren dieser Granen aufzunehmen, um abzuklären, inwieweit Eiweißstoffe neben den Nukleinsäuren an ihrer UV-Absorption beteiligt sind. In Analogie zu den Verhältnissen bei den Chromosomen darf jedoch vermutet werden, daß in den Granen Nukleoproteide angehäuft sind und daß das UV-durchsichtige Stroma arm an diesen Verbindungen sein muß.

Es scheint uns unmöglich, daß so hoch differenzierte Plastidenstrukturen wieder in den einfachen Bau der Proplastiden zurückgeführt werden. So weitgehend evoluierte Systeme können nur degenerieren, nicht aber in den embryonalen Zustand zurückkehren. Die oft auftretende Teilung der Chloroplasten (*Reinhard* 1933, v. *Wettstein* 1954) mag dazu verleiten, ihnen auch im ausgewachsenen Zustand embryonale Eigenschaften zuzuschreiben. Diese Teilungen stellen jedoch lediglich eine Durchschnürung des Plastiden in seiner bestehenden Struktur differenzierung vor und bilden keine Rückkehr in das Stadium des monogranulären Proplastiden.

Aus diesem Grunde möchten wir den Satz aufstellen, daß Proplastiden nur aus ihresgleichen hervorgehen können. Es muß daher für diese Zellorganelle eine Art Keimbahn geben, auf der sie immer im embryonalen Zustande verkehren und aus welchem Reservoir die sich differenzierenden Dauergewebe ihre Plastiden mitbekommen haben. Es darf bezweifelt werden, ob ausgewachsene Assimilationsgewebe noch Proplastiden enthalten, denn sonst müßten sich deren Chloroplasten nicht durch Teilung vermehren, sondern es könnten aus einem solchen Proplastidenvorrat zu jeder beliebigen Zeit neue Chloroplasten entstehen. Diese Keimbahn darf wohl in den primären Meristemen gesucht werden, ähnlich wie dort die Kerne



a



b

Abb. 16. Chloroplasten 2 μ dick geschnitten in Methacrylat. Die Granen sind *a* im Profil und *b* in der Aufsicht sichtbar. Aufnahme im UV-Mikroskop 254 m μ . Vergr. 2500 \times .

Eucharis grandiflora.

ihre diploide Natur bewahren und für die Bildung der gametogenen Gewebe zur Verfügung stehen. Wenn bei der Gewebedifferenzierung die Kerne durch Endomitose polyploid werden, handelt es sich um eine monotrope Entwicklung, die sie aus der Keimbahn geworfen und für die Erzeugung von Gameten untauglich gemacht hat. Etwas Ähnliches dürfte sich bei der Differenzierung der Proplastiden zu funktionsfähigen Plastiden abspielen, die als monotroper Vorgang die Rückkehr zum embryonalen Proplastiden verbietet.

Zusammenfassung

Die Theorie der reversiblen Plastidenmetamorphose wird kritisiert; an ihrer Stelle wird das Prinzip der monotropen Plastidenentwicklung vorgeschlagen und in einem Schema dargestellt. Die physiologische Tätigkeit der Chloroplasten erfolgt in drei Stufen: 1. Chlorophyll- und Granensynthese, 2. Stärkesynthese und 3. übersteigerte Carotinoidsynthese. Die

erste Stufe kann wegfallen, worauf der Proplastid zu einem Leukoplasten wird; die Stufen können sich aber auch im umgekehrten Sinne folgen, wenn ein Leukoplast nachträglich ergrünt. Nie aber wird man feststellen können, daß Granen- und Stärkesynthese gleichzeitig erfolgen.

Die dritte Stufe muß als Alterserscheinung der Plastiden betrachtet werden. Die granulären Chromoplasten können noch als normale Plastiden aufgefaßt werden, die ihr Chlorophyll abgebaut haben. Als bald setzt indessen eine Entmischung im Chromoplasten ein, wobei sich die im Übermaß erzeugten Carotinoide als Lipochrome in den Tropfen der Lipophaneroase anhäufen oder im Stroma kristallisieren.

Literatur

- Cholodnyj, N., 1923: Über die Metamorphose der Plastiden in den Haaren der Wasserblätter von *Salvinia natans*. Ber. dtsh. bot. Ges. 41, 70.
- Emberger, L., 1920, 1921: Évolution du chondriome chez les Fougères. C. r. Acad. Sci. Paris 170, 469; 173, 1485.
- Frey-Wyssling, A., und E. Steinmann, 1953: Ergebnisse der Feinbau-Analyse der Chloroplasten. Vjschr. Naturf. Ges. Zürich 98, 20.
- Friedrichs, G., 1922: Die Entstehung der Chromatophoren aus Chondriosomen bei *Helodea canadensis*. Jb. wiss. Bot. 61, 430.
- Gratzy, E., 1931: Degeneration der Chloroplasten in Farnprothallien. Protoplasma 14, 52.
- Heitz, E., 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exper. Cell Res. 7, 606.
- und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Granen. Z. Naturforsch. 8b, 243.
- Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 93.
- Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. (G. Fischer) Jena.
- Leyon, H., 1954 a, b: The Structure of Chloroplasts IV and VI. Exper. Cell Res. 7, 265 u. 606.
- Metzner, H., 1952 a: Über den Nachweis von Nucleinsäuren in den Chloroplasten höherer Pflanzen. Naturwiss. 39, 64.
- 1952 b: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. Biol. Zbl. 71, 257.
- Perner, E. S., 1954: Zum mikroskopischen Nachweis des „primären Granums“ in den Leukoplasten. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 26.
- Reinhard, H., 1953: Über die Teilung der Chloroplasten. Protoplasma 19, 541.
- Sager, R., and G. E. Palade, 1954: Chloroplast Structure in Green and Yellow Strains of *Chlamydomonas*. Exper. Cell Res. 7, 584.
- Schimper, A. F. W., 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. Jb. wiss. Bot. 16, 1.
- Schumacher, W., 1928: Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels panschiierter Pflanzen. Planta 5, 161.
- Schürhoff, P. N., 1924: Pathologie der Plastiden. In Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. I, S. 157. (Gebr. Bornträger) Berlin.
- Strugger, S., 1937: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora 131, 324.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturwiss. 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung in Chloroplasten. Ber. dtsh. bot. Ges. 64, 69.

- Strugger, S., 1953: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 459.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma 43, 120.
- Ullrich, H., 1924: Die Rolle der Chloroplasten bei der Eiweißbildung der grünen Pflanzen. Z. Bot. 16, 513.
- Went, F. W., 1943: Effect of the Root System on Tomato Stem Growth. Plant Physiol. 18, 51.
- Wettstein, D. v., 1954: Formwechsel und Teilung der Chromatophoren von *Fucus vesiculosus*. Z. Naturforsch. 9b, 476.
- Wilkins, M. H. F., and J. T. Randall, 1953: Crystallinity in Sperm Heads. Molecular Structure of Nucleoprotein in vivo. Biochem. Biophys. Acta 10, 192.
- Zimmermann, A., 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Bd. 1. Tübingen.

Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt bei Actinomyceeten

Von

Herbert Hagedorn

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster in Westfalen

Eingelangt am 14. Februar 1955

Im Rahmen der protoplasmatischen Pflanzenanatomie sind Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt (IEP_M = mittlerer isoelektrischer Punkt) an pflanzlichen und tierischen Organismen häufig durchgeführt worden (Zusammenfassung der älteren Literatur bei *Yamaha* und *Ishii* 1932). Nun darf sich jedoch das biologische Interesse nicht mit der einfachen Feststellung des IEP begnügen — dessen absolute Größe ohnehin nur annähernd erfaßt werden kann (*Schwantes* 1952) —, sondern muß sich mit den Veränderungen des IEP im Verlauf der Entwicklung der Organismen befassen, da diese u. U. Einblicke in die Physiologie der Entwicklung erlauben. Die von *Weber* (1928) postulierte physiologische Ungleichheit bei morphologischer Gleichheit ist bei vielen untersuchten pflanzlichen Objekten bezüglich der Lage des IEP gefunden worden (*Small* 1929, *Strugger* 1934, *Reuter* 1949, *Perner* 1950). Aus den in der einschlägigen Literatur gemachten Angaben über die Richtung der Gradienten im Verlauf der Entwicklung geht hervor, daß bei den botanischen Untersuchungen im Gegensatz zu den zoologischen keine einheitliche Tendenz besteht. Bei tierischen Geweben verlagert sich der IEP mit zunehmendem Alter regelmäßig zur alkalischen Seite hin. Die von botanischer Seite durchgeführten Forschungen zeigen dagegen im Verlauf des Alterungsprozesses teils eine Verschiebung des IEP zum sauren Bereich hin (*Yamaha* und *Ishii* 1933, *Drawert* 1937 bei *Allium cepa*, *Strugger* 1938 bei dem Cytoplasma von *Helodea*, *Schwantes* 1952 bei *Phycomyces*), teils ein Gefälle zum alkalischen Milieu hin (*Strugger* 1932 bei der Karyolympe von *Helodea*, *Drawert* 1938 b bei Blättern von *Helodea*).

An Bakterien wurden Untersuchungen über den IEP_M erstmalig von *Michaelis* (1911) durchgeführt. Die in der Literatur angegebenen IEP-Werte für Eubakterien schwanken zwischen pH 1,9 für *Bacillus subtilis* (*Stearn* 1925, 1931) als untere Grenze und pH 5,5 für *Sarcina flava* (*Yamaha* 1932) als obere Grenze. Vereinzelte Angaben über im stark

alkalischen Gebiet liegende IEP-Werte (so geben Winslow und Shaugnersy 1924 einen pH-Wert 13,4 für *Bacillus cereus* an) dürften vermutlich auf methodischen Fehlern beruhen.

Meßergebnisse der IEP-Werte von Actinomyceten liegen bislang nicht vor. So ist es das Ziel dieser Arbeit, den IEP und seine Veränderungen im Verlauf der Ontogenese bei den Actinomyceten zu untersuchen. Es wird ferner der Versuch unternommen, die Zusammenhänge zwischen der Ribonucleinsäure und dem IEP einer Analyse zu unterziehen.

Methode. Es wurden zwei färberische Methoden auf der Grundlage der Erfassung des Adsorptionsminimums zur Anwendung gebracht:

1. die Bestimmung des IEP_M mittels eines sauren und eines basischen Farbstoffes,

2. die Bestimmung des IEP_M mittels des Fluorochroms Acridinorange auf Grund des Konzentrationseffektes.

Ad 1. Pischinger (1926) begründet seine Methode theoretisch mit der durch die Ampholytnatur der Eiweißkörper bedingten elektrischen Umladung in abgestuften H⁺-Konzentrationen. Die Voraussetzung für diese Umladung und die darauf beruhende Speicherung von Farbstoffkationen und -anionen ist, daß der Protoplast den pH-Wert des Außenmediums annimmt. Das läßt sich bei der lebenden Zelle im Gegensatz zur fixierten nur unvollkommen erreichen. Es wurde deshalb nur mit fixiertem Material gearbeitet. Als Fixierungsmittel diente Alkohol, da dieser die elektrischen Ladungsverhältnisse nur geringfügig verändert. Da die Lage des IEP_M stark vom verwendeten Fixierungsmittel abhängig ist (Schwantes 1952), kann allen mit dieser Methode ermittelten Werten nur eine Bedeutung für vergleichende Untersuchungen zukommen.

Als Farbstoffpaar wurde Toluidin (Merck) und Säurefuchsin (Bayer) gewählt (Drawert 1937). Die Konzentration betrug 1 : 1000.

Ad 2. Das von Strugger (1940) eingeführte Fluorochrom Acridinorange (AO) wird als basischer Farbstoff oberhalb des IEP_M gebunden (Strugger 1940, 1949, Kölbel 1947). Unterhalb desselben erfolgt nur eine Imbibitionsfärbung mit grüner Fluoreszenz im Gegensatz zum Rot der elektroadsorptiv gebundenen Farbstoffkationen. Dieser im IEP erfolgende Farbumschlag beruht nach Strugger (1940) auf dem Konzentrationseffekt. Innerhalb des Dissoziationsbereiches wechselt die konzentrationsabhängige Farbe von Grün (1 : 10.000) über Orange nach Rot (1 : 500). Bei IEP_M-Bestimmungen an Bakterien (Nordmeyer 1947), tierischen (Schümmelfeder 1948) und pflanzlichen Zellen (Schwantes 1952) hat sich diese Methode als genau und praktisch erwiesen.

Methodische Durchführung. Untersucht wurden zehn Stämme, davon in mindestens zehn Parallelreihen *Streptomyces griseus*, *Streptomyces aureofaciens* (Duggar), Stamm 30 und Stamm 42 aus der Institutsammlung. Zum Vergleich wurde *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen. — Um genau bekannte Entwicklungsstadien zu bekommen, wurden Objektträgerkulturen angelegt. In einer Petrischale, die als feuchte Kammer diente, befand sich ein mit einem Tropfen Nährbouillon oder Fleischwasser versetzter Objektträger. Nach der Beimpfung dieses flüssigen Nährsubstrates

mit Luftsporen wurde im Thermostaten bei $+27^{\circ}$ bebrütet. Vor der Fixierung wurde ein Teil der Nährflüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Als Fixierungsmittel diente 90% Alkohol (3 Std.). Es wurde 15 Minuten gefärbt und anschließend 30 Minuten in farbloser Pufferlösung gespült. Die Herstellung der Farblösungen erfolgte so, daß mit $\frac{1}{15}$ mol. Phosphatpufferlösung (Strugger 1949) die Farbstammlösung auf die gewünschte Konzentration gebracht wurde und die gleiche Menge Aqua dest. zur Gewinnung der zum Spülen benutzten farblosen Pufferlösungen zugegeben wurde. Die Differenz zwischen Farb- und Pufferlösungen betrug nie mehr als 0,05 pH. Die Messungen wurden mit dem Ionometer von Püsl (München), das mit einem Glaselektrodensatz versehen ist, durchgeführt. — Nach dem Trocknen wurden die Präparate in Paraffinöl eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop von Zeiß untersucht (Apo 60 \times , Korrek., Reichert). Die mit Diachromen gefärbten Kolonien beobachtete ich im Forschungsmikroskop von Leitz ($\frac{1}{12}$ Öl, 100 : 1, Ap. 1,30; Apochromat Zeiß 120 : 1, Ap. 1,30).

Ergebnisse der Bestimmung mittels des Fluorochroms Acridinorange

Die Ermittlung der günstigsten Farbstoffkonzentration und Färbezeit ergab, daß bereits nach 5 Minuten bei 1 : 5000 eine relativ einheitliche Anfärbung erfolgte, deren Ergebnis sich auch nicht nach dreistündigem Farbbad änderte. Es bleiben auch bei sehr langen Färbezeiten (10 Std.) bei Rotfluoreszenz des gesamten Präparates stets wenige Hyphen und Sporen grün. Man kann dieses abweichende Verhalten leicht durch die begründete Annahme erklären, daß durch anhaftende Teilchen des Nährmediums ein Eindringen des Farbstoffes in die Hyphen verhindert wird. Die durch geringere Einwirkungszeiten und Konzentrationen bedingten Unregelmäßigkeiten des Farbbildes unterstreichen die Forderung Struggers (1949), im Farbüberschuß zu färben. Für die eigenen Untersuchungen wurde durchschnittlich 15 Min. mit 1 : 5000 gefärbt.

Der Übergang von Grün nach Rot über Orange erfolgte nie schlagartig, sondern innerhalb eines engen pH-Bereiches. Aus den folgenden Versuchsprotokollen ist das färberische Verhalten der Actinomyceten gegenüber AO ersichtlich:

Stamm 42, 8 Stunden alte Kultur. AO 1 : 5000, 35 Min. gefärbt, 20 Min. gespült.

pH 1,5. Sporen und Mycel fluoreszieren grün.

- „ 2,0 Die jüngsten Keimstadien (bis 20 μ lang) sowie die unausgekeimten Sporen sind grün. Längere Keimschläuche erscheinen gelbgrün.
- „ 2,2 Unverändert. Die Zahl der gelbgrünen Hyphen nimmt zu.
- „ 2,45 Die Keimstadien haben gelbgrüne oder orangefarbene Schläuche und oft rötliche Sporen. Der größere Teil der ungekeimten Sporen fluoresziert grün, der kleinere orange.
- „ 2,8 Die Verhältniszahl von orange zu grünen bei ungekeimten Sporen ist jetzt umgekehrt. Die Keimstadien zeigen fast ausnahmslos orange gefärbte Schläuche und rötliche Sporen.
- „ 3,0 Ungekeimte Sporen sowie Keimstadien fluoreszieren orange bis rot.

pH 3,75 Der rote Farbton herrscht bei Hyphen und Sporen vor. Häufig sind Keimstadien mit roten Sporen und orange fluoreszierenden Schläuchen zu beobachten.

„ 4,05 Nur noch wenige Hyphen fluoreszieren orange.

„ 4,35 Der Umschlag nach gleißend Kupferrot ist überall erfolgt.

„ 5,0 — pH 9,0 Unverändert.

Aus diesem Protokoll ist ersichtlich, daß 1. ein Farbumschlag von Grün nach Rot in Abhängigkeit des pH-Wertes erfolgt, 2. dieser Umschlag nicht plötzlich, sondern innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches vor sich geht und daß 3. Sporen und Hyphen unterschiedliche Umschlagbereiche besitzen.

Dieses Gefälle des IEP_M von den jüngsten zu den ältesten Teilen einer Kolonie wird deutlicher sichtbar, wenn man ältere Kulturen anfärbt, wie aus dem nachstehendem Protokoll hervorgeht.

Stamm 42, 48 Stunden alt. AO 1 : 5000, 15 Min. gefärbt, 10 Min. gespült. Die Kolonien liegen getrennt voneinander, so daß die Hyphen gut gefärbt und beobachtet werden können.

pH 2,0 Der älteste zentrale Teil der Kolonie ist gelbgrün. Die apikalen Teile fluoreszieren deutlich grün.

„ 2,45 Die Hyphenspitzen fluoreszieren gelbgrün, während die zentralen Teile einen orange Farbton zeigen.

„ 2,8 Unverändert.

„ 3,2 Die Grundfarbe des Mycel ist orange, nur die Enden der Hyphen lassen einen grünlichen Farbton erkennen.

„ 4,05 Unverändert.

„ 4,35 Die Masse der Hyphen ist rot bis auf die orangefarbenen Spitzen.

„ 6,0 Die ganze Kolonie fluoresziert ausnahmslos rot.

Diese Beobachtungen lassen auf einen Longitudinalgradienten des IEP_M im Zuge der Individualentwicklung schließen, wie er an anderen Objekten bereits nachgewiesen wurde (Small 1929, Strugger 1954, Reuter 1949, Perner 1950, Schwantes 1952). Und zwar besteht bei den Strahlenpilzen von den jüngsten zu den ältesten Kolonieteilen ein Gefälle zu Gebieten größerer H^+ -Konzentration hin. Die Differenz zwischen den niedrigsten und höchsten Werten des IEP_M nimmt im Verlauf des Alterungsprozesses zu. So beträgt z. B. bei einer 8 Stunden alten Kultur von Stamm 42 das Gefälle ungefähr 0,4–0,5 pH, während derselbe Stamm nach 2–3 Tagen schon fast die doppelte Differenz erreichen kann. Diese Zunahme beruht einmal darauf, daß der IEP_M -Wert der ältesten Teile der Kolonie — der Spore mit den Primärhyphen — von dem durchschnittlichen Anfangswert des IEP_M der Keimstadien von pH 2,4 absinkt. Im Extremfall wurden bei einer 8 Wochen alten Kultur von Stamm 42 IEP_M -Werte gefunden, die knapp unter pH 2,0 lagen. Zum anderen findet eine leichte Verschiebung des IEP_M der Hyphenspitzen zum Neutralpunkt hin statt. Diese Abhängigkeit des Gradienten von dem Alter der Kolonie ist schwer durch exakte Zahlen der Umschlagpunkte zu belegen, da der Umschlag immer innerhalb eines größeren Bereiches erfolgt. Zudem wird die

Beobachtung durch die Kleinheit der Objekte sehr erschwert. Die Tendenz konnte jedoch in allen untersuchten Fällen sicher nachgewiesen werden.

Daß diese mit der sehr empfindlich arbeitenden AO-Methode erfaßten Werte richtig sind, geht aus den Ergebnissen hervor, die zur Kontrolle mit den Diachromen gewonnen wurden.

Ergebnisse der Bestimmung mittels Diachromen

Die Ermittlung der optimalen Färbezeit ergab 15 Minuten, bei 30 Minuten Spülzeit im farblosen Puffer. Die Lage des IEP_M wurde dort angenommen, wo beide Farbstoffe die schwächste Färbung zeigten.

Die Hyphen waren nicht homogen angefärbt, sondern ließen viele, oft metachromatisch gefärbte Inhaltskörper erkennen, die mit Nucleoiden, Karyoiden (Bringmann 1951) oder Reservestoffen identisch sein mochten. Eine Analyse der Inhaltskörper im einzelnen erfolgte bei dieser Fragestellung nicht.

Aus den in der folgenden kurzen Zusammenstellung angegebenen Werten geht hervor, daß die mit der AO-Methode und Diachromen gewonnenen Ergebnisse weitgehend übereinstimmen.

	Diachrome	Acridinorange
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	pH 2,4—2,8	pH 2,4
<i>Streptomyces griseus</i>	" 2,0—2,4	" 2,0
Stamm 30	" 2,2—2,4	" 2,2—2,44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	" 3,0—3,3	" 3,3

Die AO-Methode ist dabei den Diachromen überlegen, da der Farbumschlag leicht beobachtbar ist und ein engerer Bereich des IEP angegeben werden kann.

Ferner wird aus diesen Zahlenwerten und aus den Ergebnissen der Tabellen 1—3 ersichtlich, daß der IEP_M für die Masse der Hyphen bei den untersuchten fixierten Actinomycetenstämmen (2 Tage alt) im stark sauren Bereich zwischen pH 2,0 und pH 3,0 liegt. Die einzelnen Stämme zeigen dabei, unter gleich bleibenden Bedingungen, konstante IEP_M-Werte, die spezifisch für den Stamm zu sein scheinen.

Untersuchungen über die Bedeutung der Ribonucleinsäure für die Lage des IEP_M

Der komplexe Aufbau des Cytoplasmas bedingt, daß sein IEP_M eine Resultante aus den verschiedenen isoelektrischen Punkten der Einzelbausteine darstellt. Da von den Bauelementen die wichtigen Nucleoproteide rein gewichtsmäßig schon bis zu 40% des Trockengewichtes der Bakterienzelle betragen können (Belozersky 1939), war anzunehmen, daß sie auch auf den IEP_M einen großen Einfluß haben würden. Es wurde dabei nur die Einwirkung der Ribonucleinsäure (RNS) untersucht. Methodisch wurde so verfahren, daß vor und nach der spezifischen Entfernung der RNS durch das spezifische Ferment Ribonuclease die IEP_M gemessen wurden.

Methode. Die Präparate wurden, wie bereits beschrieben, von Objektträgerkulturen angefertigt. Die Kolonien, die ein Alter zwischen 4 Stunden und 14 Tagen hatten, wurden mit Hilfe der Gefriertrocknung fixiert. Zur Durchführung der Fixation wurden die auf dem Objektträger schwach haftenden Kolonien für 2—3 Minuten plötzlich abgekühlt, indem sie in Isopentan von -150° Temperatur getaucht wurden. In dem auf -78° abgekühlten Rezipienten der Gefriertrocknungsanlage G 1 b von Leybold verblieben die Präparate so lange, bis der Druck der leerlaufenden Anlage erreicht war und über längere Zeit konstant gehalten wurde.

Zur spezifischen Entfernung der RNS wurde kristallisierte Ribonuclease der Fa. Worthington benutzt. Die 0,1%ige Lösung wirkte 1 Stunde bei $+37^{\circ}$ ein (pH 6,0). Kontrollen ohne Fermentzusatz wurden stets angesetzt. Nach der Fermentbehandlung schloß sich eine Spülung mit Aqua dest. (15 Min.) zur Entfernung der Fermentlösung an.

Die Ergebnisse: Pyronin und andere basische Farbstoffe bewirkten nach der Entfernung der RNS eine sehr schwache Färbung der Hyphen und Sporen. Die Orte der DNS-Ablagerung (Nucleoide, Karyoide) hoben sich durch kräftigere Färbung hervor. Bei der geringen Farbindensität war es leider nicht möglich, mit Sicherheit einen Gradienten festzustellen.

Die Färbung mit Acridinorange war ebenfalls stark geschwächt (15 Min. Färbezeit, pH 7,0, 1 : 5000). Die in der folgenden Tabelle zusammengestellten, nach der Ostwaldschen Farbtabelle bestimmten Farbwerte zeigen, daß die höchste Konzentrationsstufe ein Orangerot ist. Das gleißende Rot des unbehandelten Präparates wird nicht mehr erreicht.

pH	Vor der Entfernung der RNS	Nach
2—5	na 6 Rot	na 2 Gelbgrün
6	" 6 "	" 4 Orange
7	" 6 "	" 4 "
8	" 6 "	" 4 "
9	" 6 "	" 5 Orangerot

Hierzu liegen nach Zeiger, Harders und Müller (1951) Angaben von Gössner vor, der (an tierischen Geweben) nach der Entfernung der RNS nur noch eine Grünfluoreszenz fand und daraus den Schluß zog, daß die Farbstoffspeicherung nach Färbung mit AO nur durch NS-Proteide erfolge. Die in meiner Arbeit gefundenen Ergebnisse sprechen wohl für eine bevorzugte, aber nicht ausschließliche Bindung des AO an Nucleoproteide.

Tab. 1—3. *Protokolle der abgestuften pH-Reihen.* Die Farbstoffkonzentrationen betragen für Diachrome 1 : 1000 und für AO 1 : 5000. Die Färbungsintensität wird dadurch ausgedrückt, daß + sehr schwache, +++++ maximale Anfärbung bedeuten. In den Tabellen sind die Meßergebnisse vor und nach der fermentativen Entfernung der Ribonucleinsäure zusammengestellt.

Tab. 1. Stamm 30, 2 Tage alt, auf Glycerinagar gewachsen.
Streptomyces aureofaciens (Duggar)

pH	Vor Ribonucleaseeinwirkung				Nach Ribonucleaseeinwirkung			
	Diachrome		Fluorochrome		Diachrome		Fluorochrome	
	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot
1,5	—	+++	+++		—	+++	+++	
2,0	—	++	+++		—	+++	+++	
2,2	—	+	+++					
2,4	+	+	+	+	—	+++	+++	
2,6	+	+		+	—	+++	+++	
2,8	+	+		++	—	+++	+++	
3,0	++	—		+++	—	+++	+++	
3,2	++	—		+++	—	++	+++	
3,4	++++	—		+++	—	++	+++	
3,7	+++++	—		+++	—	+	+	
4,0	+++++	—		+++	+	—	+	+
5,0	+++++	—		+++	+++	—		++
6,0	+++++	—		+++	+++	—		+++
7,0	+++++	—		+++	++++	—		+++
8,0	+++++	—		+++	++++	—		+++

 Tab. 2. *Streptomyces aureofaciens*, 2 Tage alt, auf Glycerinagar gewachsen.
 Stamm 30

pH	Vor Ribonucleaseeinwirkung				Nach Ribonucleaseeinwirkung			
	Diachrome		Fluorochrome		Diachrome		Fluorochrome	
	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot
1,5	—	+++	+++		—	+++	+++	
2,0	—	++	+++		—	+++	+++	
2,2	—	+	++					
2,4	+	—		++	—	+		
2,6	+	—		++				
2,8	++	—						
3,0	+++	—		+++	—	++	+++	
3,2	++++	—		+++	—	+	++	
3,35	+++++			+++	—	+	++	+
3,72					+	—		+++
4,0	+++++	—		+++	+	—		
4,2					++	—		
5,0	+++++	—		+++	++++	—		+++
6,0	+++++	—		+++	++++	+		+++
7,0	+++++	—		+++	++++	—		+++
8,0	+++++	—		+++				

Tab. 3. *Saccharomyces cerevisiae*, 3 Tage alt, auf Malzagar gewachsen.
Saccharomyces cerevisiae

pH	Vor Ribonucleaseeinwirkung				Nach Ribonucleaseeinwirkung			
	Diachrome		Fluorochrome		Diachrome		Fluorochrome	
	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot	Toluidin- blau	Säure- fuchsin	grün	rot
2,0	—	+++	+++		—	+++	+++	
3,0	—	++	+++		—	+++	+++	
3,35	+	+		+++	—	++		
3,7	+	—		+++		++		
4,0	++	—		+++	—	+	+++	
4,3	++				—	+	+++	
4,7	+++	—			—	+	+++	
5,0	+++++	—		+++	—	—	+++	
6,0	+++++	—		+++	+	—		+++
7,0	+++++	—		+++	++	—		+++
8,0	+++++	—		+++	++	—		

Die Tabellen 1—3 zeigen nun deutlich, daß nach der Entfernung der RNS eine Verschiebung des IEP_M zum Neutralpunkt hin stattfindet. Bei den zehn untersuchten Stämmen traten keine wesentlichen Unterschiede auf, so daß es genügt, die Ergebnisse von zwei Stämmen (Stamm 30 und *Streptomyces aureofaciens*) mitzuteilen. Als Vergleichsobjekt wurde wieder *Saccharomyces cerevisiae* gewählt. So verschob sich der IEP_M bei

Streptomyces aureofaciens von pH 2,4 nach pH 3,7

Stamm 30 " " 2,2 " " 3,5

Saccharomyces cerevisiae " " 3,2 " " 5,0

Das entspricht einer durchschnittlichen Änderung des IEP_M um 1,4 pH bei den Actinomyceten und 1,8 pH bei der Hefe. Leider war es nicht möglich, eine sichere Aussage über einen eventuellen Gradienten zu machen, da der Umschlag innerhalb eines größeren pH-Bereiches erfolgte. Man hatte jedoch den Eindruck, daß die gleiche Tendenz wie bei dem unbehandelten Präparat vorhanden ist, wenn auch sehr abgeschwächt. Setzt man voraus, daß keine anderen Stoffe mit saurem Charakter vorliegen, so darf man mit Vorbehalt sagen, daß sich die RNS bei ihrem Einbau in das Cytoplasma im Sinne einer Erniedrigung des IEP_M auswirkt und daß der neu gefundene IEP_M derjenige der Eiweißkörper ist.

Zusammenfassung

An fixierten Actinomyceten wurden IEP_M-Bestimmungen mit Hilfe der färberischen Methode von Pischinger (1926) durchgeführt. Als Farbstoffe dienten Diachrome und das Fluorochrom Acridinorange. Vergleichende Untersuchungen beweisen die vorzügliche Eignung von Acridinorange für derartige Untersuchungen. Die Ergebnisse sind:

1. Die IEP_M der untersuchten Actinomycetenstämme liegen allgemein zwischen pH 2,0 und pH 3,0. Die einzelnen Stämme haben unterschiedliche IEP-Werte, die spezifisch zu sein scheinen.

2. Mit zunehmendem Alter der Kolonieteile sinkt der IEP_M-Wert ab. Somit besteht ein Longitudinalgradient bezüglich des IEP_M von den jüngsten zu den ältesten Kolonieteilen.

3. Die Bedeutung der Ribonucleinsäure für den IEP_M wird untersucht. Zu dem Zweck wird durch Anwendung des Fermentes Ribonuclease die RNS entfernt. Basische Farbstoffe färben danach kaum noch; das Fluorochrom Acridinorange wird jedoch noch deutlich gespeichert, wenn auch die gleißende Rotfluoreszenz der vollen Sättigung nicht erreicht wird.

4. Nach der fermentativen Entfernung der RNS wird der IEP_M um durchschnittlich 1,4 pH zum Neutralpunkt hin verschoben. Mit Vorbehalt darf man sagen, daß dieser neue IEP_M derjenige der Eiweißkörper ist.

Literatur

- Belozersky, A. N., 1939: On the nuclear substance of bacteria. *Microbiology* 8, 504—515.
- Bringmann, G., 1951: Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Studien zur Morphologie und Entwicklung von *Streptomyces griseus* Krainsky. *Zbl. Bakter. usw. I, Orig.* 157, 349—355.
- Drawert, H., 1957: Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Plastidenfärbung mit Säurefuchsin und Toluidinblau in fixierten pflanzlichen Zellen. *Flora* 151, 341.
- 1958: Protoplasmatische Anatomie des fixierten *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 29, 206.
- Gössner, W., 1949: *Verh. Ges. Patholog.* 33, Tagung Kiel, S. 102.
- Kölbel, H., 1949: Zur Kenntnis und kataphoretischen Bestimmung des IEP einiger Bakterien. *Z. Naturf.* 4b, 145.
- Michaelis, L., 1911: *Dtsch. med. Wschr.* 37, 969.
- Nordmeyer, N., 1947: Eine neue Methode zur Bestimmung vom IEP von Bakterien. *Zbl. Bakter. usw. I*, 152, 84.
- Perner, E., 1950: Die intravitale Fluorochromierung junger Blätter von *Helodea densa*. *Protoplasma* 39, 400.
- Pischinger, A., 1926: Die Lage des IEP histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Z. Biol., Abt. 13, Z. Zellforsch.* 3, 169.
- Reuter, L., 1949: Sammelreferat: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. *Phyton* 1, 229.
- Schümmelfeder, N., 1948: Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange. *Naturw.* 35, 346.
- Schwantes, H. O., 1952: Färbungsanalytische Untersuchung zur Lage des IEP der Zellbestandteile in wachsenden Zellen und Geweben. *Protoplasma* 41, 382.
- Small, J., 1929: Hydrogen-ion concentration in plant cells and tissues. *Protoplasma-Monographien*, 2. Bd.
- Stearn, A. E., und E. W. Stearn, 1931: Metathetic staining reactions with special reference to bacterial systems. *Protoplasma* 12, 435.
- Strugger, S., 1932: Über das Verhalten des pflanzlichen Zellkerns gegenüber Anilinfarbstoffen. *Planta* 18, 561.

- Strugger, S., 1934: Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. *Jb. wiss. Bot.* 79, 406.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Naturw.* 73.
- 1949: *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie.* Hannover.
- Weber, F., 1929: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. *Protoplasma* 8, 291.
- Winslow, C. E. A., and H. Y. Shaughnessy, 1924: *J. gen. Physiol. (Am.)* 6, 697.
- Yamaha, G., und T. Ishii, 1933: Über die Wasserstoffionenkonzentration und die isoelektrische Reaktion der pflanzlichen Protoplasten, insbesondere des Zellkerns und der Plastiden. *Protoplasma* 19, 1194.
- Zeiger, K., H. Harders und W. Müller, 1951: Der Struggereffekt an der Nervenzelle. *Protoplasma* 40, 76.

Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in *Anacharis canadensis*

By

H. B. Currier and W. van der Zweep¹

Department of Botany, University of California, Davis.

With 1 Figure

(Received January 8, 1955)

1. Introduction

Distinction between the living, the injured, and the dead condition is necessary in phytotoxicity studies. The various criteria that have been employed include plasmolyzability, accumulation of vital dyes, respiratory activity, and obvious necrosis—flaccidity, darkening, and abnormal growth. Plasmolysis is generally considered dependable; cells that give this response are alive; with few exceptions those that do not are dead. It gives almost immediate results, provides evidence of injury, and permits observation of individual cells. The method is, however, tedious, and it permits only limited sampling of material.

For some plants wilting and necrosis do not develop immediately, and there is difficulty in recognizing dead tissue. Such a plant is *Anacharis canadensis* (*Elodea canadensis*), a submerged aquatic that is useful in toxicity tests. Its thin leaves permit rapid equilibrium with the external solution, and absence of stomata eliminates a disturbing factor encountered in studies of leaf penetration of chemicals.

Since tetrazolium salts were first employed by Kuhn and Jerchel (1941) as vital dyes, they have been utilized in many ways to test the respiratory activity, and hence vitality, of cells, tissues, and organisms (Smith, 1951). Living cells reduce the colorless dye, 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC), to a water-insoluble red formazan. In *Anacharis* the leaves and stems become red, at times completely masking the green pigments. Dead cells do not react. The TTC reaction in this

¹ Present address: Central Institute for Agricultural Research, Wageningen, Netherlands.

plant has been shown to be a promising method in toxicity studies (van der Zweep, 1954; Currier and Peoples, 1954). Van der Zweep (1954) made the procedure quantitative by extracting the formazan with methanol, and determining the amount colorimetrically.

2. Materials and Methods

Anacharis was continuously grown in concrete tanks in the greenhouse. A layer of soil covered the bottom of the tanks, which were constantly irrigated with tap water.

Seven herbicidal chemicals were chosen to represent different types of compounds: benzene, maleic hydrazide (diethanolamine salt), disodium 3,6-endoxohexahydrophthalate (Endothal), sodium trichloroacetate (TCA), sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D), ammonium 4,6-dinitro-ortho-secondary-butylphenate (DNSBP), and 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethyl urea (CMU). Solutions were prepared using tap water, and, solubility permitting, varied in concentration 0.1 M, 0.01 M, 0.001 M, etc. Difficultly-soluble benzene and CMU were prepared as saturated solutions and diluted to 0.1 sat'd, 0.2 sat'd, etc. The pH range was 7.7 ± 0.2 , except for Endothal at 0.1 M (pH 9.2). The tap water contained, as principal solutes: anions— NO_3^- 10 ppm, Cl^- 20 ppm, SO_4^{2-} 32 ppm, HCO_3^- 397 ppm, CO_3^{2-} 0 ppm; cations— Na^+ and K^+ 46 ppm, Mg^{++} 51 ppm, Ca^{++} 33 ppm. Its specific conductance was 650 mhos at 25° C., and the pH was 7.7.

Five 3-inch shoot segments (terminal portion excluded) of *Anacharis* were incubated, with gentle agitation, for 24 hours in one liter of solution at 25° C. in weak light. Jars containing benzene solutions were capped; the others were not. Representative leaves were removed and plasmolyzed in a 9 to 1 volume mixture of 0.5 M KNO_3 and 0.5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Microscopic observation followed after 30–60 minutes. After mounting the leaves on slides, cover slips were ringed with paraffin oil. Other leaves were mounted in tap water for study. Each group of shoots was then transferred to 200 ml. of 0.05% TTC solution, pH 7.6–7.8, prepared with tap water. Comparable results were obtained with 0.05% TTC in double-distilled water containing 0.01 M phosphate mixture pH 7.6 (1–4 ratio of KH_2PO_4 and K_2HPO_4). After 16 hours in the dark at 25° C., visual estimates of red color intensity were recorded. Again representative leaves were removed, and studied both with and without plasmolysis as before.

To determine what effect prior plasmolysis would have on TTC reduction, shoots were immersed in a graded series of sucrose solutions. After 30 minutes, sufficient TTC was added to these solutions to make a 0.05% concentration. After 16 hours, microscopic observations were carried out as before. In another procedure, leaves were treated with the sucrose series as above, but after 30 minutes they were slowly deplasmolyzed by adding water over a period of an additional 30 minutes. They were then transferred to 0.05% TTC solution containing no sucrose, and the reaction studied as before.

3. Results

Data obtained in connection with treatment with herbicides are shown in Table 1. With the exception of maleic hydrazide, all of the poisons appeared to exert comparable effects on plasmolyzability and TTC reduction. That is, cells that would plasmolyze possessed the capacity to

Table 1. Responses of *Anacharis* leaves to TTC and to plasmolyzing solutions, following treatment with various herbicides.

Herbicide	Conc. M/L	Plasmolysis I Type	Extent	Formazan Produced	Plasmolysis II Type	Extent	Location of Formazan
Benzene	0.0110	—	0	0	—	0	—
	0.0098	—	0	0	—	0	—
	0.0066	Inj.	Gen.	XX	Inj.	Gen.	W + P
	0.0044	N	"	XXX	N	"	W + P
	0.0022	N	"	XXX	N	"	W + P
MH	0.1	Inj.	80%	trace	Inj.	90%	W
	0.01	N	Gen.	X	N	90%	W
	0.001	N	"	X	N	Gen.	W
	0.0001	N	"	XX	N	"	W + P
Endothal	0.1	—	0	0	—	0	—
	0.01	Inj.	50%	XX	Inj.	50%	W
	0.001	Inj.	90%	XX	Inj.	Gen.	W
	0.0001	N	Gen.	XX	N	"	W + P
	0.00001	N	"	XXX	N	"	W + P
TCA	0.1	Inj.	10%	trace	Inj.	5%	W + P
	0.01	N	Gen.	XXXX	N	Gen.	W + P
	0.001	N	"	XXX	N	"	W + P
	0.0001	N	"	XXX	N	"	W + P
2,4-D	0.1	—	0	0	—	0	—
	0.01	N	Gen.	XXX	N	Gen.	W + P
	0.001	N	"	XXX	N	"	W + P
	0.0001	N	"	XXX	N	"	W + P
DNSBP	0.01	—	0	0	—	0	—
	0.001	Inj. ^a	1%	trace ^b	—	0	—
	0.0001	Inj.	Gen.	XXX	Inj.	90%	W
	0.00001	N	"	XXX	N	Gen.	W
	0.000001	N	"	XXX	N	"	W + P
CMU	Sat'd ^c	N	Gen.	XX	N	Gen.	W + P
	0.1 sat'd	N	"	XXX	N	"	W + P
Controls	—	N	Gen.	XXX	N	Gen.	W + P

Explanation:

Plasmolysis I, after 24 hours in herbicide solutions; Plasmolysis II, after an additional 16 hours in TTC solution. N = normal, Inj. = injury plasmolysis type; Gen. = general occurrence, approx. 100%.

Formazan produced: 0 = none, X = slight, XXXX = abundant. Location: W = cell wall, P = protoplast.

a = protoplasts collapsing upon plasmolysis.

b = formazan in leaf bases only.

c = approx. 0.001 M/L.

reduce TTC, and contrariwise. That TTC reduction is not especially injurious was indicated by the fact that after 16 hours in the solution, cells containing formazan would plasmolyze, even those with considerable deposits. Infrequently, cells that contained especially large amounts of formazan did not plasmolyze and these were assumed to be dead.

The results with benzene solutions were in accord with the known action of low boiling hydrocarbons as non-specific poisons that show a definite threshold effect (van der Zweep, 1954; Currier and Peoples, 1954). As long as the cells were living, they remained capable of reducing TTC. Within leaves of *Anacharis* differences in susceptibility to benzene

were observed between various cells, quite comparable to other data on physiological differences between different leaf parts (Moder, 1952).

Maleic hydrazide in a concentration of 0.1 M/L markedly inhibited the subsequent TTC reaction in cells that were plasmolyzable. The inhibition was progressively less in the more dilute concentrations. A deviation from normal plasmolytic behavior was noted in the shoots treated with Endothal. There was swelling of the cyto-

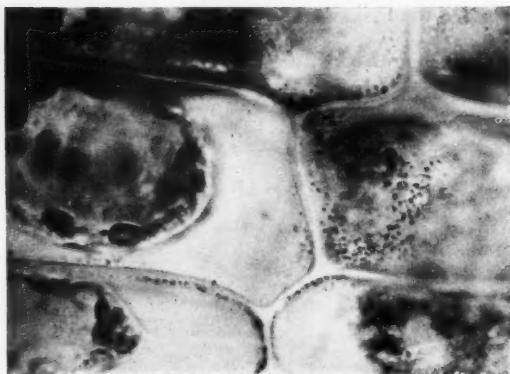


Fig. 1. Leaf cells of *Anacharis canadensis*, after 24 hours in 0.05% TTC solution at 25°C. in the dark, then plasmolyzed. Granules of formazan appear on the inner surfaces of cell walls. Not clearly shown in the photograph, granules are also present on chloroplasts. 1000X.

plasm, a delay in the separation of the protoplast from the wall, and anomalous cytoplasmic streaming that continued for some minutes in plasmolyzed cells.

In treatments with TCA, 2,4-D, and DNSBP, there was no deviation from the general result: plasmolyzable cells would reduce TTC, and cells having reduced TTC to formazan would plasmolyze. No response to CMU was noted, except that the saturated solution seemed to slightly depress formazan formation.

The cellular location of the formazan is of considerable interest. With low magnification the first detectable color appeared to develop on the cell wall. Later, the walls became more deeply colored, and, in some treatments, formazan appeared in the form of fine granules dispersed in the cytoplasm or located on the surface of chloroplasts. Longer treatments, e.g., 48 hours, produced in addition larger deposits of varying shapes in

the cytoplasm. Upon plasmolysis the cell walls remained red, i.e., they retained the formazan. High magnification revealed numerous fine red granules on the wall surface (Fig. 1).

Leaves that were plasmolyzed before adding TTC to the sugar solutions failed to develop formazan on the cell walls (Table 2). However, formazan in the form of small granules appeared in the cytoplasm and on chloroplasts later, as in unplasmolyzed cells, the amount decreasing with increasing sugar concentration. In the 1 M solution the cells were dead when examined after the 16 hours of treatment.

Table 2. Effect of plasmolysis on reduction of TTC by *Anacharis* leaf cells.

Molarity of sucrose in TTC solution	Frequency of Plasmolysis	Amount of Formazan	Location of Formazan
0	0	XXX	W + P
0.1	0	XXX	W + P
0.2	0	XXX	W + P
0.3	0	XXX	W + P
0.4	10%	XX	W + P
0.5	Gen.	X	W* + P
0.6	"	X	P
0.8	"	trace	P
1.0	"	0	—

Meaning of abbreviations given in Table 1.

* trace only.

Cells plasmolyzed and slowly deplasmolyzed before treatment with TTC exhibited the same inhibition of formazan reduction as noted in the plasmolyzed cells. Again, there was no wall coloring where the concentration of sugar in the plasmolyzing solution had been in excess of 0.4 M. As before, cells that had been plasmolyzed by 1 M sucrose solution failed to survive the TTC treatment; all others remained plasmolyzable.

4. Discussion and Conclusions

The general agreement between plasmolysis and TTC reduction indicates that the TTC method can be used in toxicity tests as a criterion of injury or death where *Anacharis* is the test plant. However, since certain conditions and chemical substances may inhibit the TTC reaction, as was noted for maleic hydrazide, the plasmolytic test should always be employed as a check method.

The appearance of formazan on the cell wall suggests that TTC reduction occurred at the protoplast surface or in plasmodesmata. Other workers have pointed out that the location of formazan is not necessarily the site of reduction, since the oil-soluble reduction product tends to accumulate in lipid phases of the cell (Betz, 1953; Preuner et al, 1952; Weibull, 1953; Ziegler, 1953).

While, therefore, there is no definite proof, it seems entirely possible that the reduction occurred at the ectoplast-cell wall interface. No oil

droplets are visible there; the formazan occurred as granules, not uniformly colored droplets; later, deposits were noted both on chloroplasts and in the cytoplasm, but wall coloring occurred first. If the reduction occurred in the cytoplasm, with diffusion of the formazan to the ectoplast, one should expect accumulation on the walls of other plants. To the authors' knowledge, neither the cell wall nor external protoplasmic surface has been reported as the site of tetrazolium reduction in any type of cell. However, the evidence for the existence of enzymes in the outer membrane of plant cells is increasing (Rothstein, 1954). Ziegler (1953) showed that in TTC reduction by several types of plant cells, formazan appears first in the microsomes, then in chloroplasts, if present, and finally as crystals in the cytoplasm. Visible lipid droplets are known to markedly accumulate the formazan (Dufrenoy and Pratt, 1948; Ziegler, 1953). Dyar (1953) found that reduction of "blue tetrazolium" (ditetrazolium) to a blue-black diformazan in several kinds of green plant tissues, including *Anacharis canadensis* leaves, also occurred as round granules in the chloroplasts and sometimes in the cytoplasm. The tests were carried out in an anaerobic atmosphere and in the light, so that the results are not directly comparable to the present findings.

The fact that plasmolysis does not displace formazan deposits on the cell wall suggests that either a) the membrane or a portion of it is retained by the wall, or b) the wall, especially the inner surface, contains a protoplasmic component. The available evidence does not support the possibility that the deposits coincide with the position of plasmodesmata in *Anacharis*. More definite conclusions as to the exact location of the granules must await further study of the cell wall in this plant. With respect to other species, Dufrenoy and Pratt (1948) treated excised sugar cane culms with TTC by placing their bases in a 0.5% solution, the dye being carried up in the transpiration stream. Formazan was detected in the region of the plasmodesmata, and the accumulation was especially pronounced at the pores of the sieve plates. Other deposits were observed in the cytoplasm and amyloplasts.

Failure of formazan to appear on the walls of plasmolyzed cells indicates that normal contact of the protoplast is essential. Failure of formazan to appear on walls of deplasmolyzed cells indicates that plasmolysis must have disturbed the intimate contact between the wall and protoplast. Certainly plasmodesmata are ruptured in the process, but it is not known if this is the reason for the inhibition.

The inhibition of the TTC reaction by maleic hydrazide is in accord with observations of Isenberg et al (1951) on a similar phenomenon observed in onion bulb tissue. These authors suggested that MH inhibits growth by blocking dehydrogenase activity, and it is such enzymes that have been postulated to be important in the reduction of TTC (Mattson et al, 1947), although there is also much evidence that a cellular enzymatic step following dehydrogenation is responsible for the reaction (Brodie and Gots, 1952; Shelton and Schneider, 1952; Kuhn and Linke, 1952). Of interest in this connection is Ziegler's (1953) report that

monoiodoacetate at 0.01 M completely inhibited the TTC reduction in onion epidermis, where the cells continued to exhibit normal plasmolytic behavior. Under these conditions the TTC method obviously fails as a criterion for distinguishing living from dead cells.

5. Summary

The plasmolytic method and the triphenyltetrazolium chloride (TTC) reaction were compared as criteria of vitality in *Anacharis canadensis*, following treatment with 7 different types of herbicides. In general there was good agreement between the two methods. Cells that were plasmolyzable exhibited the capacity to reduce TTC, and contrariwise. Maleic hydrazide, as an exception, inhibited the TTC reaction in varying degree according to concentration.

Usually formazan first appeared on the cell walls. Later, it appeared as granules deposited in the cytoplasm or on chloroplast surfaces.

The walls of cells in a plasmolyzed condition did not become colored; however, formazan was produced in the cytoplasm and on chloroplasts, the amount decreasing with increasing molarity of plasmolyticum. Cells deplasmolyzed before the TTC treatment showed the same inhibition of wall coloring as plasmolyzed cells.

The observations suggest that in *Anacharis* considerable TTC-reducing activity is located at the outer surface of the protoplast. Plasmolytic inhibition of the TTC reaction in *Anacharis* may be due to disruption of the structural entities in the surface responsible for the reaction.

Literature

- Betz, A., 1953: Untersuchungen über Verhalten und Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune Pure und Akridinorange sowie Beobachtungen über das Reduktions-Oxydationspotential in Zellen höherer Pflanzen. *Planta* 41, 325—357.
- Brodie, A. F., and J. S. Gots, 1952: The reduction of tetrazolium salts by an isolated bacterial flavoprotein. *Science* 116, 588—589.
- Currier, H. B., and S. A. Peoples, 1954: Phytotoxicity of hydrocarbons. *Hilgardia* 23, 155—175.
- Dufrenoy, J., and R. Pratt, 1948: Histo-physiological localization of the site of reducing activity in stalks of sugar cane. *Amer. J. Bot.* 35, 335—354.
- Dyar, M. T., 1953: Studies on the reduction of a tetrazolium salt by green plant tissue. *Amer. J. Bot.* 40, 20—25.
- Kuhn, R., und D. Jerchel, 1941: Über Invertseifen. VIII. Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 74, 949—952.
- Kuhn, R., und F. Linke, 1952: Quantitativer Vergleich der enzymatischen Hydrierung von Methylenblau (MB) und von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Liebigs Annalen der Chemie* 578, 155—159.
- Mattson, A. M., C. O. Jensen, and R. A. Dutcher, 1947: Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science* 106, 294—295.
- Moder, A., 1952: Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 16, 1—55.

- Preuner, R., und J. von Prittwitz und Gaffron, 1952: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bazillen und Bakterien und ihren Zusammenhang mit den sogenannten Nukleoiden. *Naturwissenschaften* 39, 128—131.
- Rothstein, A., 1954: The enzymology of the cell surface. *Protoplasmatologia* II, E, 4, 1—86.
- Shelton, E., and W. C. Schneider, 1952: The usefulness of tetrazolium salts as histochemical indicators of dehydrogenase activity. *Anat. Record* 112, 61—81.
- Smith, F. E., 1951: Tetrazolium salt. *Science* 113, 751—754.
- Weibull, C., 1953: Observations on the staining of *Bacillus megaterium* with triphenyltetrazolium. *J. Bact.* 66, 137—139.
- Ziegler, H., 1955: Über die Reduktion des Tetrazoliumchlorids in der Pflanzenzelle und über den Einfluß des Salzes auf Stoffwechsel und Wachstum. *Zeitschrift für Naturforschung* 8b, 662—667.
- Zweep, W. van der, 1954: Studies in the phytotoxicity of hydrocarbons. Ph. D. Thesis, University of California, Davis.

Sammelreferat

Über den Einfluß des Zinks auf das Pflanzenwachstum

Von

Walter Baumeister

Botanisches Institut der Universität Münster in Westfalen

Mit 7 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Februar 1955)

Erstaunlich früh, und zwar bereits 1869, wies R a u l i n nach, daß das Wachstum von *Aspergillus niger* durch Zink gefördert wird. Für die höheren Pflanzen war es dann M a z é (1914), der auf Grund seiner Untersuchungen mit Mais erkannte, daß das Zink auch für diese Pflanzen unentbehrlich ist. Trotz dieser frühen Erkenntnisse ist die Frage nach der Notwendigkeit des Zinks für die Pflanzen lange Zeit umstritten gewesen. Eine wirkliche Klärung wurde zuerst hinsichtlich der Bedeutung des Zinks für das Wachstum von Mikroorganismen erzielt. Hier wurde für *Aspergillus niger* durch Steinberg (1919, 1920, 1936 u. a.), Bortels (1927), R o b e r g (1928, 1931) und Metz (1930) der Beweis erbracht, daß das Zink für diesen Pilz unentbehrlich und als Nährstoff anzusehen ist. Damit war auch die Frage geklärt, die lange umstritten war, ob das Zink nur die Rolle eines Reizmittels spielt oder ob dem Zink der Charakter eines echten Nährstoffes zukommt. Der günstige Einfluß des Zinks bei *Aspergillus niger* wirkt sich vor allem auf die Mycelentwicklung aus. Nur mit Zink wird, wenn wir von der Steigerung der Stoffproduktion schlechthin absehen, die typische, auf der Nährlösung schwimmende, feste und mehr oder weniger gewellte Myceldecke gebildet, während der Pilz ohne Zink einmal schlecht wächst und zum anderen schleimige, untergetauchte Mycelmassen entwickelt. Indirekt wird durch die starke Beeinflussung des Mycelwachstums auch die Sporen- und Pigmentbildung gestört. Ein direkter Einfluß auf die Bildung des schwarzen Konidienfarbstoffes, wie Bortels (1927) ihn für das Kupfer nachweisen konnte, besteht hinsichtlich des Zinks nicht. Die Wirkung des Zinks auf die Entwicklung von *Aspergillus niger* ist nach R o b e r g (1928) in gewisser Weise mit der Eisenwirkung gekoppelt. Nur mit Eisen zusammen wirkt das Zink günstig, während bei ungenügender Eisenversorgung das Zink in größeren Mengen vor allem das Mycelwachstum und die Konidienfruktifikation hemmt.

Die Notwendigkeit des Zinks wurde aber auch für andere Pilze bewiesen, so von R o b e r g (1928) für *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus oryzae* und von Metz (1950) u. a. für *Aspergillus flavus*, *Penicillium sulfureum*, *Penicillium luteum*. Bei diesen Pilzen wird auch die Bildung der Konidienfarbstoffe beeinflusst. Nur bei ausreichender Zinkversorgung ist die Pigmentbildung normal. Das gilt allerdings auch für die Versorgung mit Eisen und Kupfer. Die einzelnen Wirkungen sind dabei schwer voneinander zu trennen. Hier wird daher zweckmäßig die Feststellung getroffen, daß nur bei ausreichender Versorgung der Organismen mit Zink, Eisen und Kupfer die Bildung der Konidienfarbstoffe ohne Störung abläuft.

Auch N i e t h a m m e r (1958) konnte nachweisen, daß für die Farbstoffbildung bei Pilzen Eisen und Zink zusammen notwendig sind. So bildet nach diesen Untersuchungen *Fusarium oxysporum* nur bei Anwesenheit beider Elemente den roten und den blauen Farbstoff. Fehlt das Eisen oder das Zink, so wird nur der rote Farbstoff ausgebildet. Es sei hier noch angeführt, daß L e o n i a n und L i l l y (1940) ein normales Wachstum von *Phycomyces blakesleeanus* nur bei Anwesenheit von Eisen und Zink feststellen konnten.

Hinsichtlich der Bakterien liegen ebenfalls einige Angaben darüber vor, daß sie Zink benötigen. B o r t e l s (1927) fand, daß *Bacterium prodigiosum* nur dann den Farbstoff Prodigiosin ausbilden kann, wenn ihm Zink im Nährsubstrat zur Verfügung steht. Es handelt sich dabei bekanntlich um Bakterien, die die unter den Namen „blutendes Brot“ oder „blutende Hostie“ bekannte Färbung von Brot bewirken. Für *Bacillus subtilis* konnten F e e n e y und Mitarb. (1947) nachweisen, daß sowohl das Wachstum allgemein als auch die Bildung von Subtilin im besonderen zinkabhängig ist.

Aus den genannten Beispielen dürfte klar hervorgehen, daß wir heute den Nachweis der Notwendigkeit des Zinks für Bakterien und insbesondere für Pilze als erbracht ansehen können. Hinsichtlich des Pilzes *Aspergillus niger* hat diese Erkenntnis bereits eine praktische Auswertung erfahren, da der Pilz für eine quantitative Bestimmung des Zinkgehaltes von Kulturböden Verwendung findet. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Arbeit von S t a p p und W e t t e r (1953) verwiesen, die auch ein umfangreiches Literaturverzeichnis bringt.

Für die höheren Pflanzen konnte zunächst der Nachweis erbracht werden, daß das Zink in allen Organen zu finden ist. Relativ hoch sind stets die Zinkmengen in den chlorophyllführenden Teilen der Pflanzen. W o o d und S i b l y (1950) geben in dieser Hinsicht an, daß bei der Haferpflanze 20–30% der Gesamtzinkmenge in den Blättern zu finden sind.

1908 veröffentlichte J a v i l l i e r eine umfangreiche Liste von Zinkanalysen, von denen hier aber nur erwähnt werden soll, daß der Zinkgehalt der Galmeipflanzen sehr hoch ist. Daneben wurde auch in den Coniferen ein hoher Zinkgehalt festgestellt. Neuere Analysen, vor allem auch von Nahrungsmitteln, stammen von B e r g (1925), B e r t r a n d und B e n z o n (1928) und S c h w a i b o l d und N a g e l (1939). In der Tab. 1 ist eine Auswahl der Analysenergebnisse zusammengestellt worden.

Ein Vergleich der gefundenen Zinkwerte mit den entsprechenden Zahlen für das Kupfer ergab bei den Analysen von S c h w a i b o l d und N a g e l (1939) für das Zink die wesentlich höheren Werte. B e r g (1925) berichtet über ähnliche Feststellungen beim Vergleich des Zink- und des Mangan-gehaltes. Er fand im Spinat sowie in grünen Bohnen 20 mg ZnO in 100 g

Substanz und damit Mengen, die die entsprechenden Zahlen für das Mangan übersteigen.

Tab. 1. Zinkgehalte in verschiedenen höheren Pflanzen. Werte in mg/kg Substanz.

Pflanzenteile	Zinkmenge	Autoren
Fruchtfleisch bei:		
Pfirsich, Aprikose, Pflaume	unter 1	Bertrand und Benzon
Kirschen	0,2—0,9	} Schwaibold und Nagel
Erdbeeren	0,9	
Johannisbeere	2,5	
Wurzeln von:		
Karotten, Radieschen	1—2	} Bertrand und Benzon
Blätter von:		
Karotten, Luzerne	4,0	
Radieschen	4,5	
Kopfsalat	4,7	
Rapunzel	5,0	
Kresse	5,6	
Spinat	6,2	
Zwiebeln:		
Knoblauch	10,0	
Küchenzwiebel	13,8	
Samen bzw. Früchte:		
Getreidearten	12—19	} Schwaibold und Nagel
Roggenkörner	28,0	
Roggenkleie	80,0	
Roggenkeimlinge	205,0	
Sojabohne	20,0	} Bertrand und Benzon
Wicke	23,0	
Linse	24,5	
Erbse	44,5	
Bohne	52,5	
Andere Lebensmittel:		
Banane, Blumenkohl, Tomate	2—3	} Schwaibold und Nagel
Bohnen, grün	3,2—3,6	
Erbsen, grün	8,3	
Spinat	10,3	

Besonders angereichert ist der Zinkgehalt von Pflanzen, die auf zinkreichen Böden wachsen. So konnte bereits Freytag (1868) in einem interessanten Versuch nachweisen, daß der Zinkgehalt der Pflanzen durch eine Zinkdüngung sehr stark ansteigt. Während in den Pflanzen normaler Böden kein Zink mit den damaligen Methoden nachgewiesen werden konnte,

wurden in den Blättern der Pflanzen, die auf einem Boden mit 0,2% ZnO kultiviert worden waren, folgende Zinkmengen bestimmt:

Mais	0,65%	} ZnO in der Asche
Hafer	0,63%	
Weizen	0,77%	
Roggen	0,70%	

Noch höher sind die Zinkwerte in den Galmeipflanzen. Javillier (1908) fand in den oberirdischen Teilen von *Viola calaminaria* Sm. 0,08% und von *Thlaspi calaminare* Lej. 0,50% Zink in der Trockensubstanz. Die Werte für die Wurzeln lagen mit 0,15 bzw. 0,74% noch höher. Bei den Galmeipflanzen handelt es sich bekanntlich um Pflanzen von Standorten mit einem hohen Gehalt von Galmei (Kieselzinkerz bzw. Zinkspat). Solche Böden finden sich in Westdeutschland u. a. in der Nähe von Aachen (Schwickerath 1930), in der Nähe von Osnabrück (Koch 1932) sowie bei Blankenrode in Westfalen. Der letztere Standort wird neuerdings auch von Schwanitz und Hahn (1954) erwähnt. Typisch für diese Standorte sind vor allem Zinkformen von *Viola tricolor* („Galmeiveilchen“), *Thlaspi alpestre*, *Alsine verna*, *Silene inflata* u. a. Als Beispiel für den Zinkgehalt der Galmeipflanzen seien auch noch die von Risse (zitiert nach Baumann [1885]) für Standorte aus der Nähe von Aachen ermittelten Werte angegeben:

<i>Thlaspi alpestre</i>	21,30%	} ZnO in der Asche
<i>Viola tricolor</i> var. <i>calaminaria</i>	4,28%	
<i>Armeria vulgaris</i>	6,27%	
<i>Silene inflata</i>	2,66%	

Weitere Werte für die Zinkgehalte von Galmeipflanzen hat von Linstow (1929) aus der Literatur zusammengestellt. In eigenen Versuchen (Baumeister 1954) konnte am Beispiel von *Silene inflata* Sm. nachgewiesen werden, daß die Zinkform dieser Art die hohen Zinkmengen nicht nur erträgt, sondern daß unter dem Einfluß relativ hoher Zinkgaben das allgemeine Wachstum und auch die Photosynthese sogar gefördert werden. Das gilt auch dann noch, wenn kein Originalsaatgut vom Standort, sondern Saatgut aus Sand- oder Wasserkulturen im Versuchsgewächshaus verwendet wurde. In der Tab. 2 sind einige Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt worden.

Tab. 2. Einfluß des Zinks auf die CO₂-Assimilation und Atmung bei *Silene inflata* Sm. (Zinkform vom Silberberg bei Osnabrück).

Zinkgabe in mg Zn/l als ZnSO ₄ + + 7 H ₂ O	Versuchs- datum 1953	Temp. im URAS	Atmung	CO ₂ -Assimilation	
				app.	wirkliche
				in mg CO ₂ Std. dm ²	
Ohne Zink. . . .	17./20. 6.	21°C	1,13	2,93	4,06
10 mg Zn	17./20. 6.	21°C	1,00	2,92	3,92
100 mg Zn	18. 6.	21°C	0,86	3,67	4,53

Zinkpflanzen zeigen auch im Habitus charakteristische Abweichungen. Jensch (1894) beschrieb bereits für Galmeipflanzen aus Schlesien einen

gestauchten Wuchs der Pflanzen. Besonders auffällig waren die morphologischen Unterschiede zwischen Normal- und Zinkformen bei *Tussilago Farfara* L. und *Polygonum aviculare* L. Abgesehen vom allgemeinen kümmerlichen Wuchs stellte Jensch eine bemerkenswerte Sprödigkeit beim Sproß und bei den Blättern fest. Die Wurzeln waren knotig verkrümmt, und den Blättern von *Tussilago Farfara* L. fehlte auf der Unterseite der normalerweise vorhandene Haarfilz. Die übliche herzförmige Umrißform war nach rundlich oder länglich abgeändert. Bei den Blütenstielen fiel auf, daß sie gedreht waren, und die Farbe der Blüte war tiefgelb. Auch bei *Polygonum aviculare* L. wurden noch Besonderheiten beobachtet, so eine starke Verdickung an den Verästelungen, eine mangelhafte Beblätterung und häufig ein Einrollen der Blätter. Die Blüten waren langgestielt und die Blütenkelche purpurrot gerändert.

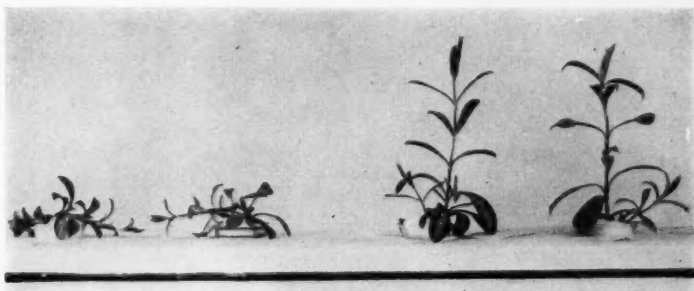


Abb. 1. *Silene inflata* Sm. in Wasserkultur mit normaler Zinkversorgung. Zweite Generation. Links Zinkform von einem Galmeistandort, rechts Normalform.

Bei *Silene inflata* Sm. konnte ich nachweisen (Baumeister 1954), daß der niederliegende, rasenbildende Wuchs der Zinkform auch dann noch in Erscheinung tritt, wenn die Pflanzen aus Saatgut gezogen wurden, das nicht mehr vom Standort stammte (Abb. 1). Es ist daher möglich, daß die Anpassung der Galmeipflanzen an den hohen Zinkgehalt der Böden bereits erblich fixiert ist.

Schwanitz und Hahn (1954) berichten über Galmeipflanzen, die aus Saatgut vom Galmeipflanzenstandort Blankenrode in Westfalen gezogen worden waren. Sie stellten an *Viola lutea* Hudson, *Alsine verna* L. und *Silene inflata* Sm. ebenfalls fest, daß die auf zinkhaltigen Böden wachsenden Formen kleiner und zierlicher im Wuchs sind, kleinere Epidermiszellen und teilweise auch kleinere Zellkerne in den Epidermiszellen als die Normalformen aufweisen.

Daß aber nicht nur die Zinkvarietäten der Galmeistandorte Zink für ein normales Wachstum benötigen, sofern man die festgestellten Abänderungen als normal bezeichnen will, sondern auch die Pflanzen anderer Standorte, darf als bewiesen angesehen werden. Einmal konnten u. a. Sommer und Lipman (1926) und Sommer (1928) bereits experimentell durch Kulturversuche mit Gerste, Buchweizen, Bohnen und Sonnenblumen (Abb. 2) die Unentbehrlichkeit des Zinks nachweisen. Zum anderen

sind zahlreiche Krankheitserscheinungen als Zinkmangelsymptome erkannt worden. Die wichtigsten äußerlich sichtbaren Erscheinungen sind: Verkleinerung von Sproß und Blättern (Zwergwuchs), Rosettenbildung durch Verkürzung der Internodien („rosette“), Absterben der Spitzen junger Triebe („die back“) sowie eine Chlorose der Blätter. Es können hier naturgemäß nur die wichtigsten Erscheinungen beschrieben werden. Zudem haben wir allen Grund zur Annahme, daß es noch viele Symptome von Zinkmangel bei Kulturpflanzen gibt, die nicht erkannt worden sind. Barnette und

Warner (1935) beobachteten helle gelbe Streifen zwischen den Adern der Blätter von Maispflanzen — bekannt als „white bud“ — und in schweren Fällen ein Absterben der Blätter unter dunkelbrauner Verfärbung (Abb. 3). Absterben der Triebspitzen junger Pflanzen, bronzene Blattfleckung und die Ausbildung von Blattrosetten waren die Folge des Zinkmangels beim Flachs. Beobachtet wurde weiter die Entwicklung neuer Seitentriebe von der Basis her nach Schädigung der Haupttriebe (Millikan 1946, Smith 1948). Zinkmangelkranke Tomatenpflanzen wiesen Zwergwuchs der Blätter („little leaf“), eingerollte Blattspreiten, Chloroseerscheinungen sowie eine nach unten gerichtete Krümmung der Blattnerven auf (Reed 1939). Darüber hinaus wurden von Eltinge und Reed (1940) charakteristische Symptome an den Wurzeln zinkmangelkranker Tomatenpflanzen beobachtet.

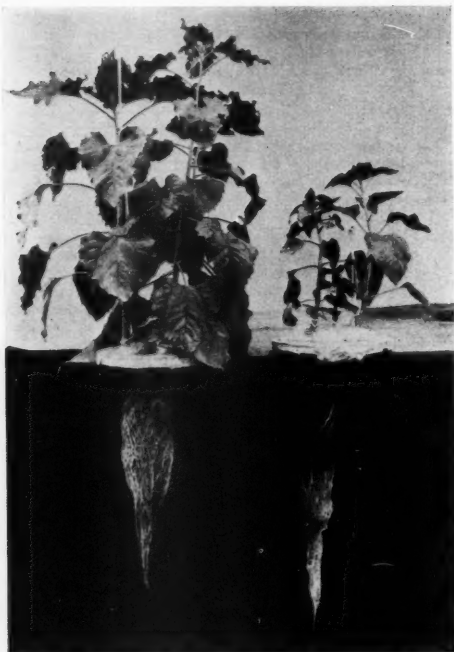


Abb. 2. Sonnenblumen in Wasserkultur. Links mit und rechts ohne Zink (aus Sommer and Lipman 1926).

Hinter der meristematischen Zone stellten sie Anschwellungen fest, die mit Büscheln vielfach unregelmäßig gestalteter Wurzelhaare besetzt waren und aus denen bevorzugt Seitenwurzeln hervorbrachen. Die Spitze der Hauptwurzeln starb vielfach ab, die weitere Verlängerung des Wurzelsystems wurde dann von den Seitenwurzeln übernommen, die aber ebenfalls bald Zinkmangelercheinungen aufwiesen.

Bei Kartoffeln wurden Zinkmangelercheinungen von Terman und Hawkins (1948) beschrieben. Sie stellten fest, daß sie besonders auf Fel-

dern auftreten, die längere Zeit ohne Fruchtwechsel mit Kartoffeln bepflanzt worden waren. In diesen Fällen wirkte sich eine Zinkdüngung besonders gut aus.

Besonders häufig sind Zinkmangelercheinungen aber im Wein- und Obstbau festgestellt worden. Dufrenoy (1935) beschreibt eine Form des Zinkmangels bei der Weinrebe. Wirtschaftlich besonders nachteilig sind in Nordamerika vor allem Zinkmangelercheinungen in den Citruskulturen, die in der amerikanischen Literatur als „mottle leaf“ oder als „frenching“ bezeichnet werden, wobei die erste Bezeichnung bevorzugt in Kalifornien und die andere in Florida gebräuchlich ist. Gerade die Zinkmangelercheinungen bei Citrusbäumen sind sehr eingehend untersucht und beschrieben worden. Hier können nur die wichtigsten Arbeiten angegeben werden, wobei gesagt werden muß, daß in ihnen ergänzend auch die Zinkmangelercheinungen bei anderen Obstbäumen, wie Aprikosen (Abb. 4) und Pflirsichen, mitbehandelt werden. Genannt werden sollen die Arbeiten von: Chandler und Mitarb. (1931, 1932, 1933, 1934), Hoagland und Mitarb. (1936), Parker (1934, 1936, 1937, 1938), Haas (1936), Chapman und Mitarb. (1937) u. a. Bei den Citrusbäumen äußert sich der Zinkmangel in Form von Zwergwuchs der Blätter, Rosettenbildung und einer gescheckten Chlorose („mottle leaf“) (Abb. 5). Für den amerikanischen Gartenbau sind noch von Bedeutung die Zinkmangelercheinungen beim Hickorynußbaum, bekannt als „pecan rosette“ und beschrieben u. a. von Alben und Mitarb. (1932) sowie von Finch (1936), und die als „bronzing“ bezeichneten Erkrankungen bei den tung-oil-Bäumen (Mowry und Camp 1934, Newell und Mitarb. 1935).

Für europäische Verhältnisse sind Zinkmangelercheinungen bei Apfelbäumen naturgemäß von besonderem Interesse. Sie sind im wesentlichen den Symptomen gleich, die bisher für Obstbäume beschrieben wurden, wie die Arbeiten von Bould und Mitarb. (1949) und von Chabannes und



Abb. 3. Zinkmangelsymptome an einer Maispflanze (aus Barnette and Warner 1935).

Mitarb. (1950) ergeben haben. Über die Verbreitung des Zinkmangels im europäischen Obstbau hat Mulder (1948, 1950) berichtet. In Deutschland ist das Auftreten von Zinkmangelsymptomen wohl verschiedentlich beobachtet worden. Berichte darüber sind mir aber nicht bekannt, mit Ausnahme einer Arbeit von Kastendieck (1948), in der über das Auftreten von Zinkmangel an Apfelbäumen in der Nähe der Versuchsstation Limburgerhof der BASF in der Pfalz Mitteilungen gemacht werden.

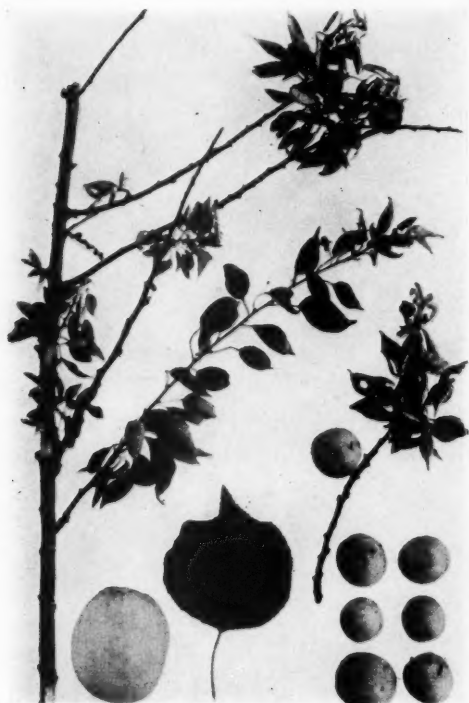


Abb. 4. Zinkmangelsymptome bei Aprikosen (aus Chandler 1937).

Daß die geschilderten sichtbaren morphologischen Veränderungen tatsächlich auf Zinkmangel zurückzuführen sind, wurde einmal u. a. von Chabannes u. Mitarb. (1950) und von Viets und Mitarb. (1953) dadurch bewiesen, daß sie in den Blättern kranker Pflanzen einen deutlich niedrigeren Zinkgehalt als in den Blättern gesunder Pflanzen feststellten. Zum anderen erbrachten u. a. Chapman und Mitarb. (1937) den Beweis, indem es ihnen gelang, „mottle-leaf“-Erscheinungen durch künstlichen Zinkmangel an in Wasserkultur herangezogenen Citruspflanzen hervorzurufen. Darüber hinaus konnten kranke Pflanzen durch eine nachträgliche künstliche Zinkversorgung wieder geheilt werden. In Kalifornien, wo „mottle-leaf“-kranke Citrusbäume sehr häufig auftreten, verfügen die Böden über eine ausgeprägte Fähigkeit zur Zinkfestlegung, so daß in diesen Gebieten eine indirekte Versorgung

der Pflanzen mit Zink auf dem Wege einer Düngung mit Zinksalzen meist nur zu geringen Erfolgen führt. Besser bewähren sich daher direkte Methoden. Diese können darin bestehen, daß die Blätter mit Zinksulfatlösungen besprüht werden, was gute Erfolge zeitigt, oder sie bestehen in der Einführung von Zinksulfatkristallen in die Stämme kranker Bäume (Parker 1934 u. a.) bzw. in einem Einschlagen verzinkter Nägel in die Stämme (Chandler und Mitarb. 1934 u. a.). Diese zuletzt genannten Methoden sind aber nicht ungefährlich, da durch örtliche toxische Konzentrationen an Zink häufig Schäden am Saffholz bewirkt werden. Diese Gefahr wird verstärkt durch die geringe Beweglichkeit des Zinks in

der Pflanze. In dieser Hinsicht ist auch die Feststellung von Wood und Sibly (1950) wichtig, daß der recht hohe Gehalt der Blätter an Zink in den absterbenden Blättern verbleibt und nicht vorher zur Versorgung junger Blätter mobilisiert wird.

Es sei noch berichtet, daß die Erscheinung von „mottle leaf“ an Citrusbäumen durch äußere Faktoren verstärkt werden können. Nach Chapman und Mitarb. (1937) tritt die Krankheit bei voller Belichtung stärker als bei schwacher Belichtung in Erscheinung, wie die genannten Autoren in Gewächshausversuchen feststellen konnten. Diese Beobachtung stimmt mit Erfahrungen aus dem Freiland überein, nach denen die Blätter zinkmangelkranker Citrusbäume stärker gescheckt sind, wenn sie auf der Südseite der Baumkronen inseriert sind. Die Blätter der Nordseite zeigen entsprechend die geringeren Schäden. In dieser Hinsicht bestehen übrigens gleichartige Erfahrungen beim Eisenmangel.

Einen Einfluß auf das Ausmaß von Zinkmangelsymptomen scheint auch die Höhe der Stickstoff- und Phosphatdüngung zu haben. Daß hohe Stickstoffgaben das Auftreten von Zinkmangelsymptomen fördern, geben Chandler und Mitarb. (1932) sowie Chapman und Mitarb. (1937) an. Letztere berichten auch über gleiche Wirkungen

hoher Phosphatgaben, Feststellungen, die für Flachspflanzen von Loneragan (1951), nicht aber von Millikan (1946) bestätigt werden. Ob hier eine echte Beeinflussung der Zinkversorgung der Pflanzen durch die Phosphatdüngung vorliegt, muß noch geklärt werden, da immerhin die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß der akute Zinkmangel durch Ausfällungen bedingt wird.

Die bisher beschriebenen morphologischen Symptome bei Zinkmangel sind durch zahlreiche histologische, cytologische und cytochemische Untersuchungen ergänzt worden. Trotz vieler und sicherlich wertvoller Einzelkenntnisse ist aber durch diese Untersuchungen die Frage nach der entscheidenden physiologischen Wirkung des Zinks nicht gelöst worden. Bei



Abb. 5. Symptome von „mottle leaf“ an einem Orangenweig (aus Reed and Dufrenoy 1935).

der Darstellung der in der Literatur vorliegenden Ergebnisse ist eine Vollständigkeit nicht möglich. Es kann nur versucht werden, die wesentlichsten Tatsachen hier zusammenzustellen.

Bei der Untersuchung der Blätter zinkmangelkranker Pflanzen sind in allen Fällen tiefgreifende Veränderungen im Mesophyllgewebe beobachtet worden. Bei Citruspflanzen fanden Reed und Dufrenoy (1935) eine Verkürzung der Zellen des Palisadengewebes bei auffälliger Verbreiterung der Zellen. So wurde die Breite der Zellen bei kranken Blättern mit 0,18 mm und bei gesunden Blättern mit 0,009 mm gemessen. Demgegenüber sind, wie Reed (1938, 1939) beschreibt, die Palisadenzellen in den Blättern zink-

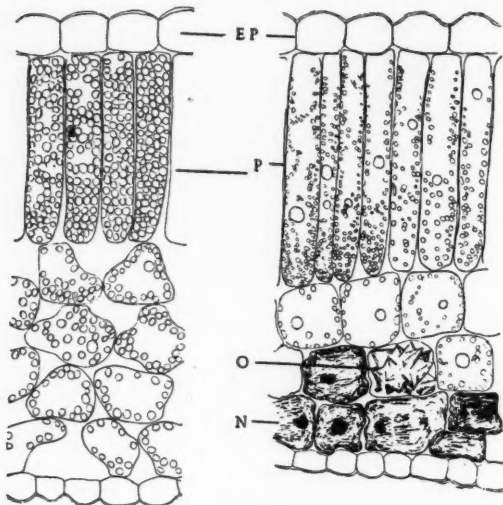


Abb. 6. Querschnitte durch Tomatenblätter. Links von gesunden und rechts von zinkmangelkranken Pflanzen (aus Reed 1939).

mangelkranker Tomatenpflanzen schmal und auffällig verlängert. Im Schwammgewebe wurde eine wesentlich kompaktere Schichtung der Zellen festgestellt (Abb. 6). Auch bei Klee und Luzerne fand Millikan (1935) eine Vergrößerung der Palisadenzellen bei Zinkmangel, so daß die Veränderung des Palisadengewebes eine durchgängige Erscheinung bei zinkmangelkranken Pflanzen zu sein scheint.

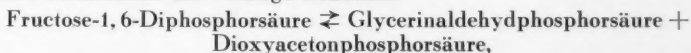
Verbunden mit den histologischen Veränderungen im Palisadengewebe sind charakteristische Beeinflussungen der Chloro-

plasten. Reed und Dufrenoy (1935) sowie Reed (1938, 1939) beschreiben, daß die Chloroplasten in den geschädigten Blättern klein bleiben, sich zusammenballen, vakuolisieren und meistens Öltropfen enthalten, während Stärke fehlt oder nur wenig vorhanden ist. In den Zellen des Schwammgewebes fiel der große Gehalt an Calciumoxalatkristallen sowie die Anhäufung dunkler, melaninartiger Massen auf. Im Schwammgewebe wurden auch die ersten nekrotischen Erscheinungen beobachtet, die von dort ausgehend sich bis zur Oberseite des Blattes ausbreiten können.

In einer späteren Arbeit wiesen Reed und Dufrenoy (1942) nach, daß sowohl in den Mesophyllzellen der Blätter als auch besonders in den postmeristematischen Zellen junger Sprosse Koazervate in den Zellsaftvakuolen auftreten, von denen sie glauben, daß es sich um Katechine und Phosphorlipide handelt. Tannin, Fette und Calciumoxalatkristalle wiederum wurden von Eltinge und Reed (1940) in den Zellen der Wurzelspitzen von Tomaten in ungewöhnlicher Menge gefunden, während Stärke

auch hier fehlte. Alle diese Befunde sprechen für eine tiefgreifende Störung der Stoffwechselprozesse in den zinkmangelkranken Pflanzen. Das Auftreten größerer Mengen von Tannin machen einige Autoren, wie Reed (1941), für die gleichzeitig beobachtete Hemmung der Zellteilung in den meristematischen Geweben verantwortlich. Es ist aber festzustellen, daß die Anhäufung der Tannine keine nekrotischen Erscheinungen zur Folge hat.

Näheren Einblick in die durch Zinkmangel hervorgerufenen stoffwechselphysiologischen Störungen gibt die Arbeit von Reed (1946). Hier konnte festgestellt werden, daß im Phloem- und Rindengewebe unter Zinkmangel leidender Tomatenpflanzen eine Anreicherung von anorganischen Phosphaten, Phenoloxidasen und Phosphatasen und eine Verringerung des Gehaltes an Hydrogenasen auftritt. Bei der großen Bedeutung, die den organischen Phosphatverbindungen besonders im Kohlehydratstoffwechsel zukommt, ist die Störung des Phosphatumsatzes in der Pflanze durch den Zinkmangel natürlich sehr wesentlich. Speziell kommt in diesem Zusammenhang auch der Tatsache Bedeutung zu, daß Zink, wie Warburg und Christian (1943) nachwiesen, die Hemmung des Fermentes Aldolase (Zymohexase) durch Cystein aufzuheben vermag. Das Ferment Aldolase steuert bekanntlich die wichtige Reaktion:



die beim Kohlehydratabbau im Organismus eine bedeutsame Rolle spielt. Es sei in diesem Zusammenhang auch erwähnt, daß Wood und Sibly (1952) die Ansicht vertreten, daß auch das Zinkprotein Carboanhydrase bei Zinkmangel in seiner Aktivität beeinflusst wird. Das muß nicht unbedingt selbstverständlich sein, da man annehmen kann, daß die zum Aufbau dieses Fermentes notwendigen Zinkspuren stets vorhanden sein dürften.

Die bereits geschilderte starke Beeinflussung der Chloroplasten kann naturgemäß nicht ohne Auswirkung auf den Chlorophyllgehalt und die CO_2 -Assimilation bleiben. Bereits 1940 berichtete Stegmann, daß in zinkfrei herangezogenen *Chlorella*-Kulturen der Chlorophyllgehalt wesentlich vermindert ist. Nach Zinkzufuhr regenerierte sich der Gehalt an Chlorophyll jedoch sehr schnell (Abb. 7). Es ist anzunehmen, daß damit auch eine Erholung der Chloroplasten insgesamt verbunden ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß Stegmann beobachtete, daß die gehemmte Zellteilung bei *Chlorella* erst deutlich später wieder normalisiert wurde. Die Regeneration der Chloroplasten ist also der primäre Vorgang.

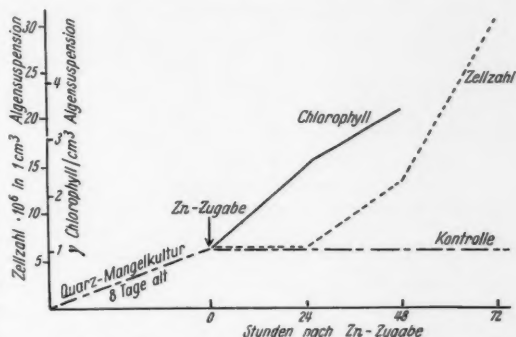


Abb. 7. Einfluß des Zinks auf Chlorophyll- und Zellproduktion bei Zinkgabe zu 8 Tage alten Mangelkulturen von *Chlorella* (nach Stegmann 1940).

Über den Kohlehydratgehalt der Blätter normaler und zinkmangelkranker Pflanzen liegen einige Angaben vor, von denen hier die von Reed (1946) mitgeteilten Werte gebracht werden sollen.

	Trocken- gewicht	Reduzierende Zucker	Rohrzucker	Stärke
Gesunde Tomatenblätter (0,5 mg Zn/l) . .	11,8%	3,75	2,00	1,50
Kranke Tomatenblätter (ohne Zink)	13,9%	4,17	1,75	0,70

Werte für Kohlehydrate bezogen auf das Trockengewicht.

Bei der Besprechung der Galmeipflanzen wurde auch schon darauf hingewiesen, daß das Zink die Photosynthese fördert. Diese Tatsache kommt auch in den Ergebnissen einiger Versuche zum Ausdruck, die von mir mit Tomaten angestellt wurden. Einige Werte dieser Versuche sind in Tab. 3 zusammengestellt worden.

Tab. 3. Einfluß des Zinks auf das Wachstum und die CO_2 -Assimilation bei Tomatenpflanzen. Beginn der Wasserkultur am 23. September 1953. Bestimmung der Frischgewichte und der CO_2 -Assimilation am 10. November 1953.

	Gewicht in g		Länge in cm		App. CO_2 -Assimilation in mg CO_2 Std. dm ²
	Wurzel	Sproß	Wurzel	Sproß	
Ohne Zink . .	4,7	36,3	24,5	55,9	3,14
1 mg Zn/l. . .	7,1	52,1	19,0	67,4	3,60

Die starke Hemmung des Längenwachstums der Internodien, die in der Rosettenstellung der Blätter an den jungen Trieben unter Zinkmangel leidender Pflanzen ja deutlich in Erscheinung tritt, läßt natürlich auch Beziehungen zwischen dem Zink und dem Wuchsstoffgehalt der Pflanzen erwarten. Tatsächlich sind in einigen Arbeiten, so in denen von Skoog (1940) und Tsui (1948), geringere Wuchsstoffgehalte bei Zinkmangelpflanzen nachgewiesen worden. Dabei war diese Verringerung des Wuchsstoffgehaltes bereits zu einem Zeitpunkt nachweisbar, an dem äußerlich sichtbare Zinkmangelsymptome noch nicht festzustellen waren. Im einzelnen wies Skoog nach, daß Zinkmangelpflanzen β -Indolylessigsäure schneller inaktivieren als die mit Zink versorgten Kontrollpflanzen. Verbunden damit ist eine höhere Oxydationskapazität der Zinkmangelpflanzen. Bei schwacher Beleuchtung oder bei Belichtung mit Rotlicht ist der Wuchsstoffgehalt der Zinkmangelpflanzen höher. Entsprechend wird auch das Längenwachstum weniger gehemmt. Das ist eine Feststellung, die mit der bereits mitgeteilten Beobachtung übereinstimmt, daß die Zinkmangelsymptome bei starker Belichtung ausgeprägter als bei schwacher Beleuchtung in Erscheinung treten. Eine künstliche Zufuhr von Wuchsstoff fördert zwar das Längenwachstum der Sprosse, vermag aber das Zink als Nährstoff nicht zu ersetzen, was ein erneuter Beweis dafür ist, daß das Zink in der Pflanze sehr komplexe Funktionen besitzt. Hinsichtlich der Wuchsstoffe vertritt Skoog die Ansicht, daß das Zink weniger für die Synthese der Wuchsstoffe als für die Aufrechterhaltung des aktiven Zustandes notwendig ist.

Das Zink beeinflusst, wie T s u i noch angibt, auch den Gehalt der Pflanzen an Tryptophan. Wuchsstoff- und Tryptophangehalt der Pflanzen nehmen nach Zugabe von Zink sehr schnell zu. Synthetisches Tryptophan wird von gesunden wie zinkmangelkranken Blättern in gleicher Weise in aktiven Wuchsstoff umgewandelt. Daraus schließt T s u i, daß das Zink wohl für die Synthese des Tryptophans direkt notwendig ist, aber nur in indirekter Weise auch für die Synthese des Wuchsstoffes.

Bei den bekannten Zusammenhängen zwischen Wuchsstoffwirkung und Wasserpermeabilität ist es nicht verwunderlich, daß einem geringen Wuchsstoffgehalt auch ein verminderter Wassergehalt bei Zinkmangelpflanzen parallel geht. T s u i (1948) konnte bei der Tomatenpflanze auch diese Zusammenhänge nachweisen und feststellen, daß der Wassergehalt der Zinkmangelpflanzen stets um einige Prozent niedriger ist als der mit Zink versorgter Kontrollpflanzen. Zwei Tage nach der Zugabe von Zink war der Wassergehalt der Tomatenpflanzen erhöht. Gleichzeitig wurde ein Anstieg im Längenwachstum der Pflanzen sichtbar. Messungen des osmotischen Druckes der Zellen ergaben zudem höhere Werte bei den Zinkmangelpflanzen als bei den Kontrollpflanzen, denen genügend Zink zur Verfügung stand.

Einige Arbeiten bringen auch noch den Nachweis, daß das Zink die Samenentwicklung fördert. Diese Wirkung des Zinks wurde von Reed (1942) bei Versuchen mit Erbsen, Bohnen und Hirse und von Wood und Sibly (1950) bei Versuchen mit Hafer beobachtet. Vöchting (1953) stellte fest, daß das Maiskorn einen Zinkgehalt von 29% Zink je Gramm Trockengewicht aufweist, wovon der wesentlichste Teil im Embryo und nur ein kleinerer Teil im Endosperm lokalisiert ist. Auch die Fruchtbildung bei den Tomaten wird durch Zink gefördert. Nicht nur Zahl und Gewicht der Früchte werden verbessert, sondern auch z. B. der Gehalt der reifen Tomaten an Vitamin C, wie Govindan (1952) berichtet.

Recht interessant sind auch die verschiedentlich aufgedeckten Beziehungen zwischen der Mikroorganismenwelt des Bodens und dem Auftreten von Zinkmangelerscheinungen im Freiland und im Experiment. Chandler und Mitarb. (1932) sowie Hoagland und Mitarb. (1936) vermuten, daß in einigen, nicht in allen Fällen das Auftreten von „mottle leaf“ bei Citrusbäumen mit der Anwesenheit von bestimmten Bakterien im Boden zusammenhängt, von denen sie annehmen, daß sie giftige Stoffe in den Boden ausscheiden, die u. a. durch Zink ausgefällt werden. Durch die damit verbundene Festlegung des Zinks im Boden entsteht ein Mangel an aufnehmbarem Zink für die Pflanzen. In schweren Fällen von „mottle leaf“ sind möglicherweise auch die giftigen Ausscheidungen der Bakterien selbst an der Schädigung der Bäume beteiligt. Ark (1937) wies dann nach, daß eine Sterilisierung des Bodens durch verschiedene Methoden die gleiche günstige Wirkung hat wie die Düngung mit Zinksulfat. Er vermochte aus den Böden zwei Bakterienarten zu isolieren, die in der Lage waren, gesunde und in zinkhaltiger kompletter Nährlösung wachsende Maispflanzen sowie junge Aprikosen- und Walnußsämlinge zu schädigen. Durch die Zugabe weiterer Zinkmengen zur Nährlösung beim Mais oder durch die Injektion von Zink in die Stämme der jungen Obstbäume konnten die Krankheitserscheinungen wieder zum Verschwinden gebracht werden.

In diesem Zusammenhang ist auch die Arbeit von Vöchting (1953) von Interesse, wenngleich die Problemstellung nicht unmittelbar mit den

vorher geschilderten Versuchen in Verbindung gebracht werden kann. Vöchting führte Versuche mit Mischkulturen von Mais und *Aspergillus niger* aus. Es wurden dabei antagonistische Beziehungen in der Weise festgestellt, daß jeweils nur ein Partner auf Kosten des anderen normal zu wachsen vermochte. *Aspergillus niger* hemmte deutlich die Entwicklung und die Zinkaufnahme beim Mais. Auch hier wird die Ansicht vertreten, daß der Pilz Stoffe in die Nährlösung ausscheidet, die die Maispflanzen schädigen. Hier handelt es sich aber um Erscheinungen, die nicht mit Zinkmangelsymptomen identisch sind, wenn auch die Zinkaufnahme reduziert war.

Die Arbeiten zeigen aber, daß Spurenelementmangel im Boden nicht nur durch Ausfällungen als Folge einer ungünstigen Bodenreaktion eintreten kann, sondern daß auch die Ausfällung giftiger Ausscheidungen von Mikroorganismen durch Metallionen zu einer Verarmung des Vorrates an aufnehmbaren Mengen wichtiger Spurenelemente führen kann. Daneben können natürlich auch die giftigen Ausscheidungen direkt schädigend wirken, doch wird man diese Wirkungen wohl in den meisten Fällen von der Auswirkung des Spurenelementmangels in der Pflanze unterscheiden können. Der ganze Fragenkomplex der Mangelercheinungen als Folge eines Fehlens von Spurenelementen bedarf aber einer erneuten gründlichen Bearbeitung auch unter der Berücksichtigung der Beteiligung von Mikroorganismen. Das ist eine Forderung, die durch entsprechende Beobachtungen bei der Mangan- und Kupferernährung bzw. deren Mangelercheinungen bei den Pflanzen unterstrichen wird. Es sei hier auf die Arbeiten von Mulder (1940 u. a.) bezüglich des Kupfers und von Gerretsen (1937) und Timonin (1950) bezüglich des Mangans verwiesen.

Abschließend darf gesagt werden, daß die im vorstehenden beschriebenen mannigfaltigen Einflüsse des Zinks auf das Pflanzenwachstum und die vielen Symptome morphologischer, histologischer, cytologischer und cytochemischer Natur bei Zinkmangel uns zu der Feststellung berechtigen, daß wir es beim Zink mit einem Spurenelement zu tun haben, dessen Unentbehrlichkeit für eine normale Entwicklung der Pflanzen außer Zweifel steht.

Literatur

- Alben, A. O., I. R. Cole, and R. D. Lewis, 1952: New developments in treating pecan rosette with chemicals. *Phytopathology* 22, 979—981.
- Ark, P. A., 1957: Little-leaf or rosette of fruit trees. VII. Soil microflora and little-leaf or rosette disease. *Proc. amer. Soc. Hort. Sci.* 54, 216—221.
- Barnette, R. M., and I. D. Warner, 1955: A response of chlorotic corn plants to the application of zinc sulfate to the soil. *Soil Sci.* 39, 145—159.
- Baumann, A., 1885: Das Verhalten von Zinksalzen gegen Pflanzen und im Boden. *Die landw. Versuchsstation* 31, 1—53.
- Baumeister, W., 1954: Über den Einfluß des Zinks bei *Silene inflata* Sm. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 205—213.
- Berg, R., 1925: Das Vorkommen seltener Elemente in den Nahrungsmitteln und menschlichen Ausscheidungen. *Biochem. Z.* 165, 461—462.
- Bertrand, G., et B. Benzon, 1928: La teneur en zinc des aliments végétaux. *C. r. Séances Acad. Sci.* 187, 1098—1101.
- Bortels, H., 1927: Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. *Biochem. Z.* 182, 501—558.
- Bould, C. D., I. D. Nicholas, I. A. H. Tolhurst, and T. Wallace, 1949: Zinc deficiency of fruit trees in Britain. *Nature (Brit.)* 164, 801—802.

- Chabannes, I., S. Trocmé et G. Barbier, 1950: Observations sur la carence zincique du pommier. *Ann. Agron. (Paris)* 1, 362—367.
- Camp, A. F., 1945: Zinc as a nutrient in plant growth. *Soil Sci.* 60, 157—164.
- Chandler, W. H., 1937: Zinc as a nutrient for plants. *Bot. Gazette* 98, 625—646.
- D. R. Hoagland, and P. L. Hibbard, 1931—1934: Little-leaf or rosette in fruit trees. *Proc. amer. Soc. Hort. Sci.* 28, 556—560; 29, 255—263; 30, 70—86; 32, 11—19.
- Chapman, H. D., A. P. Vanselow, and G. F. Liebig jr., 1937: The production of citrus mottle-leaf in controlled nutrient cultures. *J. agr. Res.* 55, 365—379.
- Chesters, C. G. C., and G. N. Rolinson, 1951: The role of zinc in plant metabolism. *Biol. Reviews* 26, 259—252.
- Dufrénoy, I., 1955: Effets du zinc sur la croissance des vitis. *C. r. Soc. Biol.* 118, 156—158.
- Eltinge, E. T., and H. S. Reed, 1940: The effect of zinc deficiency upon the root of *Lycopersicum esculentum*. *Amer. J. Bot.* 27, 331—335.
- Feeney, R. E., H. D. Lightbody, and I. A. Garibaldi, 1947: Zinc as an essential element for growth and subtilin formation by *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem.* 15, 13—17.
- Finch, A. H., 1956: Zinc and other mineral constituents in relation to the rosette disease of pecan trees. *J. agr. Res.* 52, 365—376.
- Freytag, M., 1868: Über den Einfluß des Zinkoxyds und seiner Verbindungen auf die Vegetation. *Mitt. d. landw. Akademie Poppelsdorf* 1, 82—99.
- Gerretsen, F. C., 1937: Manganese deficiency of oats and its relation to soil bacteria. *Ann. Bot. (N.S.)* 1, 207—250.
- Govindan, P. R., 1952: Influence of zinc on tomato fruits. *Current Sci.* 21, 15—16.
- Haas, A. R. C., 1956: Zinc relation in mottle-leaf of citrus. *Bot. Gazette* 98, 65—86.
- Hoagland, D. R., W. H. Chandler, and P. L. Hibbard, 1936: Little-leaf or rosette of fruit trees. *Proc. amer. Soc. Hort. Sci.* 35, 131—141.
- — and P. R. Stout, 1936: Little-leaf or rosette of fruit trees. *Proc. amer. Soc. Hort. Sci.* 35, 210—212, 216—221.
- Javillier, M., 1908: Le zinc chez les plantes. *Ann. Inst. Pasteur* 22, 720—727.
- Jensch, E., 1894: Beiträge zur Galmeiflora in Schlesien. *Z. angew. Chemie* 7, 14—15.
- Kastendieck, M., 1948: „Rosettenkrankheit“ — eine ernste Bedrohung des Obstbaues? *Ceres H.* 9, 18—19.
- Koch, K., 1952: Die Vegetationsverhältnisse des Silberbergs im Hügellgebiet bei Osnabrück. *Mitt. des naturw. Vereins zu Osnabrück* 22, 117—149.
- Leonian, L. H., and V. G. Lilly, 1940: Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. *Amer. J. Bot.* 27, 18—26.
- Linstow, O. von, 1929: Bodenanzeigende Pflanzen. 2. Aufl. *Abh. d. Preuß. Geol. Landesanstalt*, H. 114.
- Loneragan, J. F., 1951: The effect of applied phosphate on the uptake of zinc by flax. *Austral. J. Sci. Res.* 4, 108—114.
- Mazé, P., 1914: Influences respectives des éléments de la solution minérale sur le développement du maïs. *Ann. Inst. Pasteur* 28, 21—68.
- Metz, O., 1930: Über Wachstum und Farbstoffbildung einiger Pilze unter dem Einfluß von Eisen, Zink und Kupfer. *Arch. Mikrobiol.* 1, 197—251.

- Millikan, C. R., 1946: Zinc deficiency in flax. J. Dept. Agr. Victoria 44, 69—73; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 1, Spalte 1916. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1948.
- 1953: Relative effects of zinc and copper deficiencies on lucerne and subterranean clover. Austral. J. Biol. Sci. 6, 164—177.
- Mowry, H., and A. F. Camp, 1954: A preliminary report on zinc sulphate as a corrective for bronzing of tung trees. Florida agric. exper. Stat. Bull. 273, 34; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 1, Spalte 1916/17. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1948.
- Mulder, E. G., 1940: Über den Kupfermangel als Ursache der Urbarmachungskrankheit. Z. Pflanzenkrankh. (Pflanzenpathol.) Pflanzenschutz 50, 230—264.
- Mulder, M. D., 1948: Carences zincique chez les arbres fruitiers en Europe. C. r. Acad. Agric. France 34, 177—178.
- 1950: Zinc deficiency of fruit trees in Europe. Lotsya 3, 85—86.
- Newell, W., H. Mowry, R. A. Barnette, A. F. Camp, and R. D. Dickey, 1955: The tung oil tree. Florida agric. exper. Stat. Bull. 280, 5; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 1, Spalte 1918. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1948.
- Niethammer, A., 1938: Wachstumsversuche mit mikroskopischen Bodenpilzen. Arch. Mikrobiol. 9, 23—30.
- Parker, E. R., 1954, 1956—1958: Experiments on the treatment of mottle leaf of citrus trees. Proc. amer. Soc. Hort. Sci. 31, 98—107; 33, 82—86; 34, 215—215; 35, 217—226.
- Raulin, M. I., 1869: Études chimiques sur la végétation. Ann. sci. naturelles Botanique (Paris) 11, 95—299.
- Reed, H. S., 1938: Cytology of leaves affected with little-leaf. Amer. J. Bot. 25, 174—186.
- 1939: The relation of copper and zinc salts to leaf structure. Amer. J. Bot. 26, 29—33.
- 1941: Effects of zinc deficiency on cells of vegetative buds. Amer. J. Bot. 28, 10—17.
- 1942: The relation of zinc to seed production. J. agr. Res. 64, 635—644.
- 1946: Effects of zinc deficiency on phosphate metabolism of the tomato plant. Amer. J. Bot. 33, 778—784.
- and Dufrénoy, J., 1935: Modification in cell structure accompanying mottle leaf of the orange. Amer. J. Bot. 22, 311—328.
- 1942: Catechol aggregates in the vacuoles of cells of zinc deficient plants. Amer. J. Bot. 29, 544—551.
- Roberg, M., 1928: Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf Aspergillen. Zbl. Bakter. II, 74, 335—370.
- 1951: Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Zinks für *Aspergillus niger*. Zbl. Bakter. II, 84, 196—230.
- Schwaibold, J., und G. Nagel, 1959: Die Bestimmung kleiner Mengen an Kupfer, Blei und Zink mit Dithizon mit besonderer Rücksicht auf die Bestimmung in biochemischen Materialien. — III. Das Vorkommen von Kupfer, Blei und Zink in pflanzlichen Produkten und Lebensmitteln. Vorratspflege und Lebensmittelforschung 2, 231—235.
- Schwanitz, F., und H. Hahn, 1954: Genetisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Galmeipflanzen. Z. Bot. 42, 179—190.
- Schwickerath, M., 1950: Das *Violetum calaminariae* der Zinkböden in der Umgebung Aachens. Beitr. z. Naturdenkmalpflege 14, 463—503.

- Skoog, F., 1940: Relationships between zinc and auxin in the growth of higher plants. *Amer. J. Bot.* 27, 939—951.
- Smith, W. P. C., 1948: Zinc deficiency of flax. *J. Agric. W. Austr.* 25, 136—142; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 2, Spalte 248. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1951.
- Sommer, A. L., 1928: Further evidence of the essential nature of zinc for the growth of higher green plants. *Plant Physiol.* 3, 217—221.
- and C. B. Lipman, 1926: Evidence of the indispensable nature of zinc and boron for higher plants. *Plant Physiol.* 1, 231—249.
- Stapp, C. und C. Wetter, 1953: Beiträge zum quantitativen, mikrobiologischen Nachweis von Magnesium, Zink, Eisen, Molybdän und Kupfer im Boden. *Landw. Forschung* 5, 167—180.
- Stegmann, G., 1940: Die Bedeutung der Spurenelemente für *Chlorella*. *Z. Bot.* 35, 384—422.
- Steinberg, R. A., 1919: A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. *Amer. J. Bot.* 6, 350—372.
- 1920: Effect of zinc and iron compared with that of uranium and cobalt on growth of *Aspergillus niger*. *Bot. Gazette* 70, 465—468.
- 1936: Relation of accessory growth substances to heavy metals, including molybdenum, in the nutrition of *Aspergillus niger*. *J. agr. Res.* 52, 439—448.
- Termann, G. L., and A. Hawkins, 1948: Response of potatoes to zinc. *Amer. Fert.* 109, 26; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 2, Spalte 249. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1951.
- Timonin, M. I., 1950: Soil microflora and manganese deficiency. *Trans. 4th Intern. Congr. Soil Sci. Amsterdam* 3, 97—99, 498—499; Ref.: Minor elements, 4. Aufl., Bd. 3, Spalte 132. Chilean Nitrate Educational Bureau, New York 1953.
- Tsui, Ch., 1948: The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. *Amer. J. Bot.* 35, 172—179.
- 1948: The effect of zinc on water relation and osmotic pressure of the tomato plant. *Amer. J. Bot.* 35, 309—311.
- Viets, F. G. jr., L. C. Boawn, C. L. Crawford, and C. E. Nelson, 1953: Zinc deficiency in corn in central Washington. *Agronomy J.* 45, 559—565.
- Vöchting, A., 1953: Über die Aufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v. Tiegh. in Einzelkultur und in Mischkultur. *Ber. schweiz. bot. Ges.* 63, 103—161; zugleich Diss. Universität Basel 1954.
- Warburg, O., und W. Christian, 1945: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Zymohexase. *Biochem. Z.* 314, 149—176.
- Wood, I. G., and P. M. Sibly, 1950: The distribution of zinc in oat plants. *Austral. J. Sci. Res. B* 3, 14—27.
- 1952: Carbonic anhydrase activity in plants relation to zinc content. *Austral. J. Sci. Ser. B* 5, 244—255.

Kurze Mitteilung

Ringförmige Zellinhaltskörper bei *Spirogyra maxima*

Von

Oswald Kiermayer

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. Januar 1955)

Die Erforschung artspezifischer Zellinhaltskörper stellt heute zweifellos eine der wichtigsten Aufgaben der Zellanatomie dar. Während man in Zellen höherer Gewebepflanzen bereits eine große Anzahl verschiedenartiger Inhaltskörper, sei es in Form von Kristallen, amorphen Klumpen oder bestimmt geformten Körpern verschiedener chemischer Art, finden konnte, liegen bei Algen, zumal bei den Konjugaten, noch verhältnismäßig wenige Berichte über derartige Inhaltskörper vor. Es ist daher gerade in dieser Pflanzengruppe notwendig, spezifischen Zelleinschlüssen, die vielleicht auch zur systematischen Charakterisierung von Algen herangezogen werden könnten, besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

In nachfolgender kurzer Mitteilung soll über einen eigenartig geformten Zellinhaltskörper bei *Spirogyra maxima* (Hassell) berichtet werden.

Im April 1954 stand mir ein artenreiches *Spirogyra*-Material, das von verschiedenen Exkursionen eingebracht worden war und zu zellphysiologischen Untersuchungen am Pflanzenphysiologischen Institut kultiviert wurde, zur Verfügung. Dichte Algenwatten stammten aus einem alten Ziegelteich in Mödling bei Wien¹ und wurden von Dr. I. Lenk (1954) nach Transeau (1951) als *Spirogyra maxima* (Hassell) bestimmt.

Bei genauer mikroskopischer Betrachtung der Einzelzellen fiel auf, daß bei dieser (und nur bei dieser) Art jede Zelle eines Fadens an einer bestimmten Stelle im wandständigen Plasmaschlauch eigenartige Körperchen aufwies. Die Gebilde waren farblos, etwas stärker lichtbrechend als ihre Umgebung, 12 bis 18 μ lang und 6 bis 10 μ breit.

Die Formen dieser Körperchen zeigten größte Mannigfaltigkeit: Am häufigsten konnte man ovale, in der Aufsicht ringförmige Gebilde feststellen (Abb. 1, 2), die, von der Seite her betrachtet, sanduhr- oder biskottenförmig erschienen (Abb. 3). Diese „Grundform“ war aber in vielen Fällen

¹ Legit. cand. phil. Walter Wimmer.

so stark abgewandelt, daß sich die „Ringkörper“, seitlich betrachtet, oft haken-, spulen- oder amboßförmig ausnehmen. Wie auf Abb. 4, a—o ersichtlich, erscheinen die Gebilde in der Seitenansicht durch eine beiderseitige

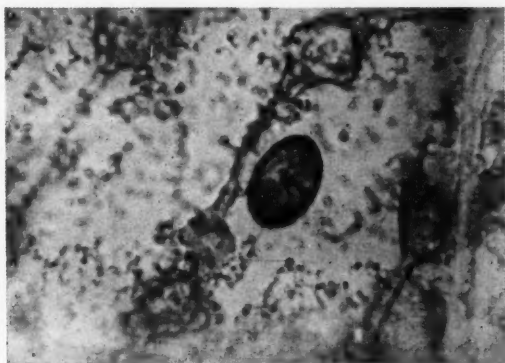


Abb. 1. Ovaler Ringkörper bei *Spirogyra maxima* in der Aufsicht. In der Mitte des Gebildes ist deutlich eine Einschnürung zu erkennen. Photographiert bei Immersionsvergrößerung 1200 \times .

tiefe Einschnürung in der Mitte aus zwei Teilen zusammengesetzt. Der „Isthmus“ zwischen den beiden Teilen ist meist sehr eng (Abb. 4 a, f), wird

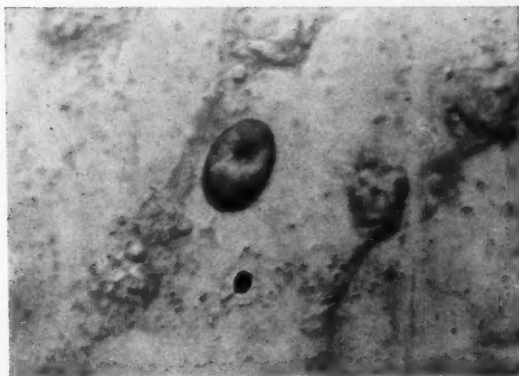


Abb. 2. Derselbe Ringkörper wie in Abb. 1, jedoch bei schräger Beleuchtung. Die zentrale Eindellung sowie ein oberer und unterer Höcker deutlich sichtbar.

aber in einigen Fällen durch eine hellere Masse stark verbreitert (Abb. 4 c, d, h).

Neben diesen einfachen Formen ließen sich häufig auch zusammengesetzte, sphäritähnliche Gebilde beobachten (Abb. 4 f, m), die in einigen

Fällen zierliche, oft bizarr anmutende Stacheln oder Zacken trugen (Abb. 4 m).

Die genannten Ringkörper fanden sich meist in Einzahl, vielfach aber auch bis zu sechs im wandständigen Plasm Schlauch einer Zelle, wo sie von der Plasmaströmung leicht mitbewegt wurden. Es konnte häufig beobachtet werden, daß neben einem großen, deutlich sichtbaren Körperchen noch mehrere kleine, oft „schemenhaft“ sichtbare Gebilde lagen, die sich von ihrer Umgebung nur undeutlich abhoben, trotzdem aber schon die typische Ringgestalt zeigten. Diese „schemenhaften“ Körper verhielten sich, wie später noch gezeigt werden wird, gegen Vitalfarbstoffe anders als die großen, deutlich sichtbaren.

Bei ein und demselben Zellfaden fanden sich die Ringkörper stets an derselben Stelle jeder Einzelzelle, was wahrscheinlich auf das Absinken der

Körper in Richtung der Schwerkraft zurückzuführen ist. Bei Zentrifugierung der Zellen (1 Minute bei 2500 Touren) verlagerten sich die Körperchen stark zentrifugal.

Wurde eine *Spyrogyra*-Zelle durch mäßigen Druck mittels einer Präpariernadel auf das Deckglas zerdrückt, wodurch der Zellinhalt aus der Zelle herausquoll, so zeigte sich, daß die Körperchen im Wasser unlöslich sind. Bei noch stärkerem Druck geben sie sich als feste, kompakte Körper zu erkennen, die schließlich in einzelne scharf gekantete Teilstücke zerfallen.

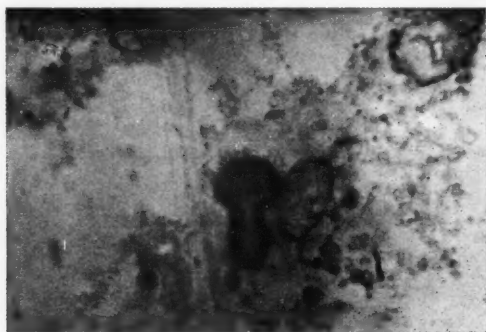


Abb. 5. Der Inhaltkörper bei *Spirogyra maxima* in der Seitenansicht. Der Ringkörper ist mit Toluylenblau (1 : 15.000, pH 10,1) gefärbt. Rechts neben dem amboßförmigen Gebilde ist ein ungefärbter, nur „schemenhaft“ sichtbarer Körper festzustellen. Photographiert bei Immersionsvergrößerung 1200 \times .

Im Polarisationsmikroskop erscheinen die Ringkörper sehr stark doppelbrechend.

Um über die chemische Natur dieser Gebilde Aufschlüsse zu erhalten, wurden mikrochemische und vitalfärberische Reaktionen durchgeführt:

Chemische Reaktionen

1. 10% HCl: Rund um die Gebilde entstehen kleinste Körnchen. Die Körper selbst lösen sich unter Körnchenbildung vollkommen auf und sind nach ca. 5 Minuten nur mehr als stark granuliert, unförmige Masse zu erkennen.

2. 5% H_2SO_4 : Auflösung der Ringkörper unter Körnchenbildung.

3. Konz. Ammoniak: Körper unlöslich; nach vollkommener Desorganisation des Zellinhaltes Körperchen normal erhalten.

4. Millonsches Reagens: Körper gelbbraun gefärbt, etwas verquollen.

5. Karmin-Essigsäure: nach längerer Zeit Auflösung der Körperchen.

6. Sudan III: keine Färbung.
7. Kaliumbichromat: Körper unverändert.
8. Jodjod-Kali: keine Anfärbung.
9. Chlorzinkjod: keine Anfärbung.
10. Äthylalkohol: Körper unlöslich.
11. Xylol: Körper unlöslich.
12. Glycerin: Körper unlöslich.

Vitalfärberische Nachweise

1. Neutralrot (1 : 15.000, gelöst in Wiener Leitungswasser, pH um 7,8): Körper färben sich rot an.

2. Brillantkresylblau (1:15.000, gepuffert auf pH 10,1): Körperchen färben sich violettblau an.

3. Toluylenblau (1 : 15.000, gepuffert auf pH 10,1): Selektivfärbung der Körperchen. Während der übrige Zellinhalt vollkommen farblos bleibt, färben sich die Ringkörper intensiv blau an.

4. Rhodamin B (1 : 5000, gelöst in Aqua dest.): Körperchen leicht rot gefärbt. Im UV-Licht schwache rote Fluoreszenz. (Die Körper zeigen keine Eigenfluoreszenz.)

Wie bei Vitalfärbeversuchen festgestellt werden konnte, nehmen stets nur die großen, deutlich ausgebildeten Ringkörper eine Färbung an, während die „schemenhaft“ sichtbaren Gebilde ungefärbt bleiben (Abb. 3). Vielfach sind rund um die Körper kleine, stark gefärbte Körnchen, die sich in lebhafter BMB befinden, festzustellen. An Stelle der Ringkörper war in einigen Zellen eine große Anzahl gefärbter Krümel in lebhafter BMB zu sehen.

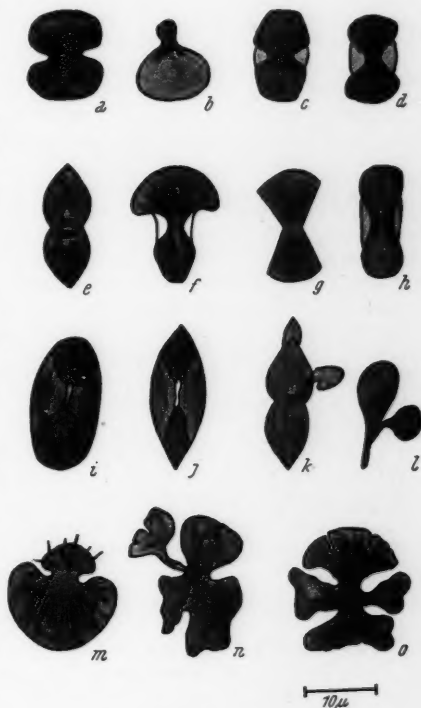


Abb. 4. a—h. Verschiedene Formen des Ringkörpers in der Seitenansicht. Bei c, d, f und h ist der „Isthmus“ durch eine hellere Masse verbreitert; i und j: die typische Form des Ringkörpers in der Aufsicht; k, l, n, o: zusammengesetzte Körper in der Seitenansicht; m: sphäritartiger Körper (Seitenansicht) mit Stacheln.

Zusammenfassung

In den Zellen von *Spirogyra maxima* (Hassell) konnten im wandständigen Plasmabelag eigenartige, in der Aufsicht ovale Ringkörper festgestellt werden, die, seitlich betrachtet, sanduhr- oder biskottenförmig erschienen. Die Form der 12 bis 18 μ langen und 6 bis 10 μ breiten Körper-

chen zeigte große Mannigfaltigkeit und wich oft stark von der genannten charakteristischen Gestalt ab.

Die Körperchen sind in Wasser, konzentriertem Ammoniak, Alkohol, Xylol und Glyzerin beständig, lösen sich dagegen in verdünnter Salz- oder Schwefelsäure unter Körnchenbildung auf. Die Stärkereaktion mit JJK verlief negativ.

Mit Vitalfarbstoffen wie Neutralrot, Brillantkresylblau, Toluylblau und Rhodamin B zeigten die Körper starke Anfärbung. Besonders Toluylblau, ein für Vitalfärbversuche noch wenig verwendeter, jedoch sehr brauchbarer Farbstoff (vgl. Kiermayer 1955) wird von den Ringkörpern selektiv gespeichert und ist deshalb zu deren Nachweis ganz besonders geeignet.

Die Körperchen zeigten ferner im Polarisationsmikroskop starke Doppelbrechung.

Nach der eigenartigen Gestalt, der starken Doppelbrechung sowie der Färbbarkeit durch Vitalfarbstoffe erscheint ein Vergleich der Ringkörper mit „Lipoid- oder Phytosteringebilden“ gerechtfertigt. Solche fand Scharinger (1936) in den Epidermiszellen der Blütenblätter verschiedener Ranunculaceen. Sie zeichneten sich durch ihre eigenartige Gestalt, eine starke Doppelbrechung und durch die Färbbarkeit mit Vitalfarbstoffen aus. Ähnliche Körper beschreibt auch Guilliermond (1937) in der Epidermis der Zwiebel von *Lilium candidum* und bei *Saprolegnia*. Pribik (1947) findet bei Resistenzversuchen mit Spurenelementen bei *Helleborus niger*, *Paeonia officinalis* und *Convallaria majalis* ringförmige Phytosteringebilde.

Auf Grund der ähnlichen Eigenschaften der bei *Spirogyra maxima* vorgefundenen Ringkörper und der genannten Phytosteringebilde dürfen erstere, mit aller Zurückhaltung, als ähnliche lipoidartige Gebilde angesehen werden. Da allerdings mehrere chemische Reaktionen gegen diese Annahme sprechen, müssen bis zur vollständigen Charakterisierung der Inhaltskörper noch weitere Untersuchungen abgewartet werden.

Literatur

- Guilliermond, A., 1937: Sur la présence de lipides (phospholipides et stérides) dans les vacuoles de certaines cellules végétales. *Protoplasma* 27, 290.
- Kiermayer, O., 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. 1 (in Druck).
- Lenk, I., 1954: Zur Spirogyren-Flora von Niederösterreich. *Verh. d. Zool.-Bot. Ges. in Wien* 94.
- Molisch, H., 1923: *Mikrochemie der Pflanze*. 3. Aufl. Gustav Fischer, Jena.
- Scharinger, W., 1936: Cytologische Beobachtungen an Ranunculaceenblüten. *Protoplasma* 25, 404.
- Pribik, E., 1947: Das Resistenzverhalten verschiedener pflanzlicher Plasmen gegenüber einigen Spurenelementen (Diss., Wien).
- Transeau, E. N., 1951: *The Zygnemataceae*. The Ohio State University Press, Columbus 1951.

Referate

Rieger, R., und A. Michaelis: Genetisches und cytogenetisches Wörterbuch. Herausgegeben von H. Stubbe. Mit 59 Abb., IV, 140 S. (Der Züchter, 2. Sonderheft.) DM 23.50 (Vorzugspreis für Bezieher des „Züchter“ DM 18.80). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1954.

In einer Wissenschaft, die sich in wenigen Jahrzehnten so gewaltig entwickelt hat wie die Genetik, wimmelt es von Fachausdrücken, die den Forschern und Lehrern der benachbarten Disziplinen noch nicht recht in Fleisch und Blut übergegangen sind. Durch die Fülle dieser „Fremdworte“ wird die Lektüre der genetischen Literatur für alle, die nicht selbst auf diesem Gebiete arbeiten oder die sich erst einarbeiten wollen, außerordentlich erschwert und die Genetik bleibt so manchen ein durch Termini technici versiegeltes Buch. Das ist ein unhaltbarer Zustand. Bei der eminenten Bedeutung der Genetik und Cytogenetik für Theorie und Praxis der verschiedensten biologischen Fächer war es von höchster Dringlichkeit, ein Mittel zu finden, daß diese Siegel löst und so den Weg in dieses wundervolle Land auch den Nicht-Spezialisten freigibt. Es konnte kein besseres Mittel dazu gefunden werden, als ein Wörterbuch zu schaffen, das alle die Fachausdrücke erläutert, die aus den klassischen Sprachen gebildet oder modernen Sprachen, besonders dem Englischen, entnommen sind und vor denen so mancher Biologe bisher ratlos und hilflos stand. 2500 Fachausdrücke sind in diesem verdienstvollen Buche aufgenommen; sie sind in zwar knapper, aber wirklich präziser und klarer Weise erörtert. Mit diesem Wörterbuch in der Hand werden sich viele an das Studium der genetischen Literatur heranwagen, die sich bisher durch die genetische „Fremdsprache“ abschrecken ließen. Bei den einzelnen Stichwörtern des Wörterbuches wurde, „wo immer möglich“, auch der Autor und das Jahr genannt, in dem der Terminus geprägt wurde, in anderen Fällen beziehen sich Name und Jahreszahl in dem sehr ausführlichen Schriftenverzeichnis auf eine Publikation, in der weitere Literatur angeführt wird. Der Fernerstehende wird dabei allerdings leider nicht immer wissen, ob der angeführte Autor der Schöpfer der betreffenden Bezeichnung ist. Die in nicht geringer Zahl beigegebenen schematischen Skizzen sind ausgezeichnet und erleichtern ganz wesentlich das Verständnis der ja oft recht komplizierten Verhältnisse. Kleine Schönheitsfehler kommen natürlich auch in diesem Wörterbuche vor, so wenn es unter „Plastiden“ heißt: Selbstteilungskörper, die Träger bestimmter Farbstoffe sind: a) Chloroplasten, b) Chromoplasten, c) Leucoplasten, wobei die Definition auf die Leucoplasten natürlich nicht zutrifft.

F. Weber (Graz).

Schussnig, Bruno: Grundriß der Protophytologie. Mit 407 Abb. im Text. VIII, 310 S. Jena: G. Fischer. 1954. Geb. DM 28.—.

Das bekannte, durch die Eigenart der Darstellung und die erstaunliche Verarbeitung eines schwer zu übersehenden Schrifttums hervorragende „Handbuch der Protophytenkunde“ des Verfassers hat in dem vorliegenden Werk ein Seitenstück besonderer Prägung erhalten. Die „Erschließung des Werdeganges im Gestaltungsgeschehen“ wurde hier in den Vordergrund gestellt. Daraus ergab sich die Gliederung in die Hauptabschnitte: 1. Die Gestaltung bei den einzelligen Protobionten, 2. Die Gestaltung bei den coenoblastischen Protophyten, 3. Die Gestaltung bei den polyblastischen Protophyten, wozu als Anhang gestellt wird: Die Gestaltung bei den Charophyten. — Die durch vortreffliche Abbildungen unterstützte Anschaulich-

keit des Gebotenen erleichtert das Verständnis des mit bewundernswürdiger Stoffbeherrschung und in flüssigem Stil vorgetragenen Textes, der freilich mit einer geradezu erdrückenden Anzahl neuer Fachausdrücke belastet ist. Die neuen Ergebnisse der Zellforschung mögen vielleicht auf vielen Gebieten sonst nicht auszuwerten sein; aber der Referent bezweifelt, ob eine solche Fülle verschiedenster Termini für den Rahmen eines Grundrisses unbedingt notwendig ist. Er hält es weiters für wenig zweckmäßig, seit langem eingeführte und gewissermaßen abgebrauchte Ausdrücke in einem neuen Sinne zu verwenden, z. B. „Promyzel“ nicht nur für Brandpilze und Rostpilze, sondern auch für *Monoblepharis*, oder „Gonidien“ oder gar „Samenknospe“, worunter der Verfasser den oft als Antheridium angesprochenen Spermogonienstand von *Chara* versteht. Daß übrigens bei *Chara* die von den Knoten der Langtriebe ausgehenden Berindungsschläuche „positiv geotropisch“ wachsen und mehrkernig werden, ist wohl ein Irrtum; auch verlaufen die Berindungsschläuche der Eizelle nicht „spiralig“, sondern schraubig. Sprachlich zu verbessern wären u. a. „Nodien“ bzw. „das Nodium“ in Nodi bzw. Nodus, hingegen „Capitulus“ selbstverständlich in Capitulum. Wohin der teilweise Verzicht auf eine klare Trennung von Phasenwechsel und Generationswechsel führt, zeigt die recht verwickelte Schilderung der Fortpflanzung der Rotalgen, wobei sogar der Begriff „Triphasische Rhodophyceen“ angewendet wird. In einem ausdrücklich der studierenden deutschen Jugend gewidmeten Werk sollte in einer neuen Auflage die übergroße Zahl unnötiger Mode- und Fremdwörter, wie z. B. „Dehydratation“, „interpoliert“, „inhibiert“, „manifest“, „opportun“, „in komparativer Hinsicht“, „abbreviativ einkonstruiert“ usw. usw., wenigstens verringert werden. Dann wird man dieses vom Verlag vorzüglich ausgestattete Buch als eine wertvolle, sehr willkommene, moderne Einführung in das Reich der Thallophyten um so mehr zu schätzen wissen.

F. Widder (Graz).

Ubisch, Leopold von: Entwicklungsprobleme. IV, 196 Seiten, 65 Abb. im Text. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1953. Brosch. DM 12.70.

Die inhalts- und gedankenreiche Schrift formuliert die behandelten Probleme mit großer Klarheit und Präzision, sie ist in drei Hauptteile gegliedert: I. Plasmareifung. II. Determinationsproblem. III. Gradiententheorie und Zuordnungsproblem. Das Wesen der Eireifung darf nicht nur in den Vorgängen der Kerneifung gesehen werden, sie setzt sich vielmehr aus den Vorgängen der Plasmareifung und der Kernreifung zusammen. Dabei gehen Veränderungen in der plasmatischen Struktur des reifenden Eies vor sich, die Verteilung der Einschußsubstanzen im Ei ist bedingt durch die Struktur der plasmatischen Grundsubstanz, die Einschußsubstanzen selbst haben im allgemeinen keine direkte organogenetische Bedeutung. Die Determination beruht nicht auf einer Sonderung organbildender Stoffe auf die einzelnen Zellen oder Keimbezirke, sie ist vielmehr bedingt durch die Struktur des Grundplasmas. Der Grad der Regulationsfähigkeit ist davon abhängig, ob und wie lange die Grundplasmastruktur nach Störungen veränderlich ist und wie weit die ursprüngliche Struktur wieder hergestellt werden kann. Das Plasma bestimmt, welche Differenzierungsrichtung ein Kern einschlägt, d. h. welcher Teil seines Genoms in der betreffenden Zelle wirksam wird. Nach einer kritischen Erörterung der Gradiententheorie von Child bis Daley wird die vom Autor entwickelte Zuordnungshypothese dargelegt. Sie besagt, daß die Gradienten Zustandsgefälle der Grundsubstanz des Cytoplasmas sind. Worin diese Gefälle bestehen und wie sie entstehen, bleibt allerdings unbekannt, hypothetisch ist natürlich auch die Annahme der Zuordnung der Gene zu den Plasmabezirken. Die Hypothese hat aber zweifellos heuristischen Wert und gibt so Impulse zu weiterer Forschung.

F. Weber (Graz).

Kurze Mitteilung

Kiermayer, O.: Ringförmige Zellinhaltskörper bei <i>Spirogyra maxima</i>	150
--	-----

Referate	155
---------------------------	-----

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Diakus, A.: Färbestudien an den Schleimkörperchen und Schleimauausscheidungen einiger Euglenen	1. 3. 1955
Pfeiffer, H. H.: Quantitative Versuche über das Fadenziehvermögen von Fibroblasten	4. 3. 1955
Erdmann, K.: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultraviolettem Licht und von Röntgenstrahlen auf Euglobulin mit Strahlenschutzstoffen	14. 3. 1955
Amelunxen, F.: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceae	18. 3. 1955
Kinzel, H.: Ein einfaches Mikrokolorimeter	19. 3. 1955
Höfler, K., und H. Schindler: Volle und leere Zellsäfte bei Algen.	28. 3. 1955
Fasse-Franzisket, Ursula: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei <i>Agapanthus umbellatus</i> L'Hérit	1. 4. 1955
Reiter, Liselotte: Zerfall homogener Epiphyllum-Eiweißspindeln in Fibrillen	8. 4. 1955
Badenhuizen, N. P.: The Structure of the Starch Granule.	13. 4. 1955
Amelunxen, F.: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Cactaceae	19. 4. 1955
Kamiya, N., and M. Tazawa: Studies on Water Permeability of a Single Plant Cell by Means of Transcellular Osmosis	30. 4. 1955
Penso, G.: Cycle of Phage Development Within the Bacterial Cell	23. 5. 1955
Weihe, K. v.: Die Bedeutung der Grenzflächenenergie für die Gestaltung der Zelle	24. 5. 1955
Mühlethaler, K.: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden	26. 5. 1955
Stubbe, W., und D. v. Wettstein: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von <i>Oenothera</i>	27. 5. 1955
Huber, Elfriede: Über den schädigenden Einfluß von Neutralrot auf <i>Spirogyra</i> -Zellen	28. 5. 1955
Stalfelt, M. G.: The Protoplasmic Viscosity of Terrestrial Plants and Its Sensitivity to Light	3. 6. 1955
Tschermak-Woess, Elisabeth: Karyologische Pflanzenanatomie	12. 6. 1955
Flasch, Assunta: Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen	14. 6. 1955
Millié, D., und Biljana Plavšić: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virussträgern	15. 6. 1955
Woochsmann, H.: Der Stand des Metachromasie-Problems	21. 6. 1955
Weber, F.: Eiweißspindeln und -kristalle in <i>Scutellaria</i>	3. 7. 1955
Balrati, A., and F. E. Lehmann: Structural and chemical properties of the contractile vacuole of <i>Amoeba proteus</i>	8. 7. 1955
Currier, H. B., and S. Strugger: Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of <i>Allium cepa</i> L.	9. 7. 1955
Strugger S., und M. Losada-Villasante: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von <i>Chlorophytum comotum</i>	9. 7. 1955
Bünning, E., G. Hunck und H. Lutz: Über die Rolle longitudinaler und radialer Polaritätsgradienten bei der Gewebedifferenzierung von Pflanzen	18. 7. 1955

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Protoplasmatologia

Handbuch der Protoplasmaforschung

Unter Mitwirkung hervorragender internationaler Fachleute herausgegeben von

L. V. Heilbrunn und F. Weber

Philadelphia

Graz

In 14 Bänden

Das Handbuch erscheint in selbständigen Einzelveröffentlichungen, die in kurzen Zeitabständen aufeinanderfolgen und zu Bänden vereinigt werden. Jeder selbständig erscheinende Handbuchteil ist einzeln käuflich. Über die Disposition des Gesamtwerkes und die nächsten Veröffentlichungen gibt der Verlag bereitwilligst Auskunft. Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches, bei Vorbestellung der einzelnen Teile sowie für Abonnenten der Zeitschrift „Protoplasma“ ermäßigt sich der Preis um 20%.

Sobald erschienen:

Band XI/2: Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Von Dr. Lotte Reuter, Privatdozent der Universität Wien. Mit 64 Textabbildungen. IV, 131 Seiten. Gr.-8°. 1955.

S 204.—, DM 34.—, \$ 8.10, sfr. 34.80

Vorbestellpreis, gültig bis 31. August 1955: S 163.—, DM 27.20, \$ 6.50, sfr. 27.80

Band II/B/2/c: The pH of Plant Cells. By Prof. Dr. James Small, The Queen's University Belfast, Department of Botany. — **The pH of Animal Cells.** By Professor Dr. Floyd J. Wiercinski, Hahnemann Medical College, Department of Physiology, Philadelphia/Pa. With 10 figures. IV, 172 pages. Gr.-8°. 1955.

S 270.—, DM 45.—, \$ 10.70, sfr. 46.—

Vorbestellpreis, gültig bis 31. August 1955: S 216.—, DM 36.—, \$ 8.55, sfr. 36.80

Demnächst erscheinen:

Band VIII/7/a: Active Transport through Animal Cell Membranes. By Paul G. LeFevre, Medical Branch, Division of Biology and Medicine, U. S. Atomic Energy Commission, Washington, D. C. With 31 figures. Approx. 140 pages. Gr.-8°. 1955.

S 228.—, DM 38.—, \$ 9.—, sfr. 38.70

Vorbestellpreis, gültig bis 30. September 1955: S 182.40, DM 30.40, \$ 7.20, sfr. 31.—

Band X/1: Red Cell Structure and Its Breakdown. By Prof. Dr. Eric Ponder, The Nassau Hospital, Mineola, N. Y. With 58 figures. Approx. 140 pages. Gr.-8°. 1955.

S 240.—, DM 40.—, \$ 9.50, sfr. 40.90

Vorbestellpreis, gültig bis 30. September 1955: S 192.—, DM 32.—, \$ 7.60, sfr. 32.70

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

